

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Bases Moleculares y Fisiopatológicas del Contraste
por Transferencia de Magnetización en Imágenes
por Resonancia Magnética**

Marina Benito Vicente

Madrid, 2006

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Bases Moleculares y Fisiopatológicas del Contraste
por Transferencia de Magnetización en Imágenes
por Resonancia Magnética**

Tesis presentada por la licenciada en

Bioquímica:

Marina Benito Vicente

Para optar al grado de Doctor

Dirigida por:

Paloma Ballesteros García
Laboratorio de Síntesis Orgánica e Imagen Molecular,
Instituto Universitario de Investigación
Universidad Nacional de Educación a Distancia

Sebastián Cerdán García-Esteller
Instituto de Investigaciones Biomédicas
“Alberto Sols” C.S.I.C./U.A.M.

y

Maria Luisa García Martín
Instituto de Investigaciones Biomédicas
“Alberto Sols” C.S.I.C./U.A.M.

Madrid, 2006



MINISTERIO DE
EDUCACION
Y CIENCIA



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS "ALBERTO SOLS"



Sebastián Cerdán García-Esteller, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, adscrito al Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC/UAM,

Paloma Ballesteros García, Catedrática de Química Orgánica de la Universidad Nacional de Educación a Distancia,

y,

Maria Luisa García Martín, Investigador contratado Ramón y Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, adscrito al Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC/UAM

CERTIFICAN:

Que **Dña. Marina Benito Vicente** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado "Bases Moleculares y Fisiopatológicas del Contraste por Transferencia de Magnetización en Imágenes por Resonancia Magnética" que presenta como Tesis Doctoral. En nuestra opinión y salvo mejor criterio del Tribunal que ha de juzgarla, el trabajo realizado reúne las condiciones científicas exigidas para poder optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Madrid, a 10 de Noviembre de 2006,

Fdo.: Sebastián Cerdán García-Esteller

Fdo.: Paloma Ballesteros García

Fdo.: Maria Luisa García Martín

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer a mis directores de Tesis, al Dr. Sebastián Cerdán, a la Dra. Paloma Ballesteros, y a la Dra. Maria Luisa García por haberme dirigido esta tesis, por ayudarme y por iniciarme en mi carrera científica. Gracias por haber confiado en mí.

También quería agradecer a mi tutora, la Dra. Maria Antonia Günther con su ayuda en las correcciones de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio que se fueron y que no por ello los he olvidado a Susana, Toñi, Juan, Sandra. A los que siguen y van viniendo: a Patricia, Tiago, Jesús, Teresa, Sandra, Vanesa Belén y a Pili, mi compi de viajes, gracias por estar ahí cuando lo he necesitado. Y a la gente que ha venido a trabajar de estancia: a Rui, David, Teresa, Inés, Luis y Valeria. A todos, gracias por aguantarme.

Al grupo de la UNED: a Elena, a Maria, a Jordi, a Manuel y a Yolanda. Muchas gracias por vuestras palabras y por los cafelitos llenos de azúcar y optimismo. Para Elena Soriano, muchísimas gracias por tu ayuda con los cálculos de química computacional, por tu paciencia y por tus múltiples palabras de ánimo.

A Laura Barrios por su valiosa ayuda con los estudios estadísticos.

Al personal del IIB no me lo tengáis en cuenta si se me olvida algún nombre, en especial quería agradecer a Fernando sus palabras de apoyo, al servicio de informática por ayudarme con mi compi de trabajo fiel aunque a veces bobo y desobediente. Al servicio de imagen: Javi muchas gracias, sin ti, esta tesis no tendría color. Y por ultimo al servicio de Patología Experimental, al Dr. Carlos Gamallo por sus consejos y en especial a Teresa Alcalá, muchísimas gracias por tu ayuda.

También quería agradecer al Dr. Gillies por acogerme y haberme dado la oportunidad de estar en su laboratorio de Arizona. De esta manera pude conocer a Silvia y a Gary, personas excepcionales dignas de conocer y aprender de ellos tanto profesional como personalmente. A Peggy, a Jonathan Coles, a Anne Ziegler, a Regine Farion, a Chantal Remy y a Cristoph Segebarth por acogerme en su laboratorio durante mi estancia en Grenoble.

A mis amigos del Hospital Gregorio Marañón, no tengo palabras, ya lo sabéis: Javi, gracias por apoyarme tanto, confiar en mí y ser mi amigo. Enhorabuena por el peque! A Manolo Desco y a Cristina Santamarta, muchísimas gracias por adoptarme en mis principios y darme la oportunidad que me disteis sin saber lo que era un espectro. Y al Dr. Carlos Antoranz sin él, no estaría donde estoy, gracias por presentarme a la profesora Paloma Ballesteros, de esta manera pude entrar a formar parte del grupo estratégico que dirigía Paloma.

A mis amigos: Marta, Merche, Anita, Carmen, Estrella y Alberto, la paciencia que habéis tenido conmigo no se puede describir con palabras, gracias por las risas de los buenos momentos y gracias por los abrazos de los malos momentos. Tras todo este tiempo en el IIB he conocido a personas cuya amistad espero no perder a Bea, a Isabel, a Jimena, a Pablo, Mari Carmen y a las dos Anas, tampoco os quedáis cortos de paciencia. Y luego, aunque esté lejos y no me pueda entender por ahora

(porque sé que estás estudiando español) quería también dedicárselo a Li Wei, mi amigo resonante taiwanés.

Y ahora viene la parte mas difícil porque me faltan palabras para expresar todo lo agradecida y orgullosa que estoy de mi familia, porque ellos han sufrido y alegrado mas que yo para lo malo y para lo bueno, porque siempre han estado ahí y siempre me han dado una sonrisa, un abrazo y sobretodo me han hecho sentir la hija, y la hermana mas afortunada del mundo. Somos familia numerosa pero no por ello voy a dejar de decir sus nombres porque se lo merecen. A mis padres, Carlos y MariCarmen os dedico por entero este trabajo, siempre habéis estado junto a mi, apoyándome, levantándome detrás de cada tropiezo y queriéndome a pesar de algún que otro grito por mi parte, perdona mamá!. A mis hermanos, Yolanda, Mamen, Carlos y Cristina, muchísimas gracias por vuestro incondicional apoyo, por vuestras palabras de ánimo y por vuestras sonrisas. Me siento muy orgullosa de tener unos hermanos así. Y me da igual si queda exagerado o no, (tantos nombres y tanta familia) pero también quería citar a Victor, Rafa, Gema y Carlos, porque también formáis parte de mi vida y familia, a mis primos y mis tías. Y por ultimo a los más pequeñitos, Oscar, Elsa, Sofia y al panchito que viene, prometo llamarlo por su nombre cuando nazca.

Y que nadie se ofenda pero quería dedicar de manera muy especial a Alex, mi novio, la persona que me hace suspirar día tras día. Alex, tu si que has tenido paciencia conmigo con mis dudas y problemas informaticos. Muchísimas gracias por el soporte informático (pensabas que no te lo iba a decir, eh?).

Alex, no has parado de darme aliento, de transmitirme palabras de optimismo y de hacerme reír como nadie cuando mas lo necesitaba, me has dado un abrazo cuando te lo pedía y sobretodo me has llenado mi corazón. Una persona muy cercana a ti me dijo un día que eras una persona muy dulce, creo que se quedó corta en describirte. Muchísimas gracias Alex, por abrirme un huequito en tu corazón y por hacerme tan feliz. Y por supuesto a tu familia, por abrirme las puertas de vuestro hogar. Muchas gracias de todo corazon.

Y por último no puedo terminar de agradecer esta tesis sin mencionar a las pobres ratitas que han hecho que este trabajo pudiese salir adelante, perdonadme, sobretodo algunas ;o) . Os habéis ganado un huequito en el cielo de las ratitas. Ah! protoncillos y grupos NH, os he ganado la batalla!



***"Lo hermoso del desierto es que en
cualquier parte esconde un pozo"***

Antoine de Saint-Exupéry

"El Principito" 1943

RESUMEN

Esta Tesis investiga, *in vitro* e *in vivo*, las bases moleculares y fisiopatológicas de los procesos de Transferencia de Magnetización entre protones de macromoléculas y el agua circundante, mediante espectroscopía de alta resolución ^1H -RMN e imagen por Resonancia Magnética (IRM). Se ha empleado como sistema modelo *in vitro*, soluciones acuosas de glutatión oxidado, un dipéptido formado por dos cadenas de glutámico, cisteína y glicina, unidas por un puente disulfuro. Este péptido presenta grupos NH_2 y NH que intercambian su magnetización intramolecularmente y con los protones del agua libre presentes en la disolución. Nuestro estudio ha investigado la dependencia del intercambio de magnetización con el pH, la temperatura y la microviscosidad. La termodinámica del intercambio se estudió empleando espectros 2D y las ecuaciones de Van't Hoff. Los resultados indican que el intercambio de magnetización es un proceso reversible dirigido entrópicamente a pH 4.0 y 9.0, y entálpicamente a pH 6.5, en el caso de las moléculas de agua. Sin embargo, los intercambios entre los protones de los grupos NH y las moléculas de agua están dirigidos entrópicamente en todos los casos. Mediante experimentos de pulso y gradiente se investigó la variación en el coeficiente de difusión aparente del agua. Un aumento de la viscosidad de la solución reduce el intercambio de magnetización hasta en un 45%, lo que indica que en estos procesos, los movimientos traslacionales de las especies en intercambio juegan un papel importante. Nuestros resultados también demuestran que los procesos de intercambio dependen del pH y del pK_a de los grupos intercambiables, resultando cinética y termodinámicamente más favorables entre los protones de las moléculas de agua de la solución que entre los protones del glutatión o entre el glutatión y el agua. Paralelamente se investigó mediante química computacional la energía de interacción entre diversas regiones del péptido y el agua de solvatación, estableciendo que las moléculas de agua se distribuyen más favorablemente alrededor del grupo NH_2 del glutámico, seguido del grupo NH de la glicina y por último alrededor de los grupos NH de la cisteína.

La información obtenida sobre los mecanismos involucrados en la Transferencia de Magnetización *in vitro* se aplicó *in vivo* en un modelo animal con glioblastoma multiforme. En este caso, comparamos el contraste generado por Transferencia de Magnetización con otros tipos de contraste convencionales ponderados en T_1 , T_2 o ADC. Nuestros resultados indican que la combinación de las diferentes modalidades de contraste es más potente que su empleo individual en la delimitación de los bordes tumorales. El análisis multiparamétrico, píxel por píxel, de las diversas modalidades permitió determinar los bordes del tumor, edema, necrosis y tejido sano con una precisión de un 95%.

SUMMARY

This PhD Thesis investigates *in vitro* and *in vivo*, the molecular and physiopathological basis of the magnetization exchange processes occurring between macromolecular protons and the surrounding water, using ^1H -NMR spectroscopy and MRI. We used aqueous solutions of oxidized glutathione as *in vitro* models for magnetization exchange. Oxidized glutathione is a dipeptide containing two chains of glutamic acid, cysteine and glycine coupled through a disulfide bridge. The peptide presents NH and NH_2 groups which exchange magnetization intramolecularly and with the solvating and free water protons from the solution. We investigated the dependence of the exchange of magnetization on pH, temperature and microviscosity. The thermodynamics of exchange were investigated using z spectra and Van't Hoff equations. In particular, the exchange of magnetization is reversible and directed entropically at pH 4.0 and 9.0 and enthalpically at pH 6.5. However, the exchange between protons of NH groups and water molecules is directed entropically in all cases. The variation of exchange with the translational diffusion coefficient of water was investigated using pulse field gradients experiments. An increase of solution viscosity reduced up to 45% the magnetization exchange indicating that the translational movements of species play a dominant role in the magnetization exchange processes. Our results show also that these processes depend on the pH of the solution and the pK_a of exchanging groups, resulting kinetic and thermodynamically more favourable the magnetization exchange between water protons than the exchange between glutathione protons and water protons. We used computational chemistry methods to investigate the interaction energy between different regions of peptide and the solvating water, establishing that water molecules arrange more favourable around to NH_2 group of glutamic, followed by NH group of glycine and finally around NH group of cysteine.

The information obtained on magnetization exchange processes *in vitro* was extended to the *in vivo* situation with an animal model of glioblastoma multiforme. In this case we compared the contrast generated by Magnetization Transfer with more conventional contrast like T_1 , T_2 or Diffusion weighted images. Our results indicate that the combination of the different contrast modalities is more powerful than the individual types. A pixel by pixel multiparametric analysis of the different contrast modalities, allowed us to determine the limits of the tumor, edema, necrosis and healthy tissue with a precision of 95%.

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Fundamentos de Transferencia de Magnetización	2
<i>1.1.1. Antecedentes</i>	2
<i>1.1.2. Protones libres y ligados en medio biológico</i>	2
<i>1.1.3. Mecanismos implicados en el intercambio de magnetización</i>	4
<i>1.1.4. Interpretación cinética del intercambio. Ecuaciones de Bloch</i>	6
<i>1.1.5. Transferencia de Magnetización y pH. Agentes de contraste extrínsecos CEST. Contraste intrínseco Amide Proton Transfer (APT)</i>	9
1.1.5.1. Agentes CEST	10
1.1.5.2. Contraste intrínseco de la imagen por APT	12
<i>1.1.6. Transferencia de Magnetización y difusión molecular rotacional y translacional</i>	13
1.2. Imagen por Resonancia Magnética	14
<i>1.2.1 Fundamentos del contraste por Imagen de RM. Papel de la Transferencia de Magnetización y la Difusión</i>	14
1.2.1.1. Características generales del contraste en imágenes por Resonancia Magnética	14
1.2.1.2. Imagen Pesada en Difusión	16
1.2.1.3. Imagen pesada en Transferencia de Magnetización	16
1.3. Imagen multiparamétrica. Aplicación <i>in vivo</i> de la Transferencia de Magnetización como herramienta en la delimitación de los bordes tumorales	19
2. OBJETIVOS	21

	Página
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Materiales	24
3.2. Preparación de soluciones de glutation oxidado como modelo <i>in vitro</i> en los procesos de Transferencia de Magnetización	24
3.3. Resonancia Magnética <i>in vitro</i>	25
3.3.1. <i>Espectroscopia RM de Alta Resolución. Secuencias</i>	25
3.3.2. <i>Determinación de las magnitudes termodinámicas del proceso de Transferencia de Magnetización</i>	27
3.3.3. <i>Relación entre difusión translacional y transferencia de magnetización</i>	29
3.3.4. <i>Imagen multiparamétrica in vitro. Adquisición de Imágenes por Resonancia Magnética, ponderación en T_1, T_2, T_M y difusión</i>	30
3.4. Estudio computacional: obtención de mapas de interacción molecular del sistema agua-glutation oxidado	32
3.5. Animales y Diseño Experimental	33
3.5.1. <i>Cultivos de células C6</i>	33
3.5.2. <i>Implantación estereotáxica de células C6 en cerebro de rata</i>	34
3.5.3. <i>Preparación de animales para imagen RM</i>	36
3.5.4. <i>Análisis histológico de cerebro de rata</i>	37
3.6. Resonancia Magnética <i>in vivo</i>	37
3.6.1. <i>Adquisición de Imágenes RM, ponderación en T_1, T_2 y difusión</i>	37
3.6.2. <i>Optimización de la secuencia de Transferencia de Magnetización. Adquisición de Imágenes con Transferencia de Magnetización</i>	38
3.6.3. <i>Parámetros de adquisición de las imágenes de RM</i>	40
3.7. Procesamiento de imágenes y obtención de mapas paramétricos	42
3.8. Análisis Estadísticos en imágenes paramétricas. Diseño experimental y proceso estadístico	44

	Página
4. RESULTADOS	47
4.1. El glutation oxidado como modelo para la caracterización de procesos de Transferencia de Magnetización <i>in vitro</i>	48
4.1.1. <i>Asignación de las resonancias de 1H RMN de glutation</i>	48
4.1.2. <i>Determinación del pK_a de los grupos NH del glutation</i>	49
4.1.3. <i>Propiedades termodinámicas de la Transferencia de Magnetización. Modelo de Interacción Molecular</i>	51
4.1.3.1. <i>Determinación de las variables termodinámicas</i>	51
4.1.3.2. <i>Mapas de Interacción molecular glutation-agua</i>	55
4.1.4. <i>Influencia de la microviscosidad del medio y del coeficiente de difusión translacional</i>	61
4.1.4.1. <i>Influencia de la microviscosidad</i>	61
4.1.4.2. <i>Energía de activación de la difusión translacional</i>	65
4.1.5. <i>Imagen de Resonancia Magnética potenciada en T_1, T_2, difusión y TM sobre maniqués. Obtención de mapas paramétricos <i>in vitro</i></i>	69
4.2. Experimentos de Transferencia de Magnetización <i>in vivo</i>	74
4.2.1. <i>Optimización de la secuencia</i>	74
4.2.1.1. <i>Mapas paramétricos <i>in vivo</i></i>	76
4.3. Análisis estadístico discriminante aplicado a la delimitación de los bordes tumorales	78
4.3.1. <i>Funciones de Fisher. Mapas de probabilidad</i>	85
4.4. Correlación con los estudios de anatomía patológica	85
5. DISCUSIÓN	88
5.1. Intercambio químico y su relación con el pH	89
5.2 Experimentos de alta Resolución	91
5.2.1. <i>Influencia del estado de ionización de los grupos intercambiables</i>	91
5.2.2. <i>Mecanismos de la Transferencia de Magnetización y su dependencia con el pH. Estudio de la termodinámica en la Transferencia de Magnetización</i>	94

	Página
5.2.3. <i>Influencia de la viscosidad en los procesos de Transferencia de Magnetización</i>	94
5.2.4. <i>Mapas de Interacción Molecular</i>	95
5.3. Correlación entre los experimentos de alta resolución e imagen en soluciones de glutation	96
5.3. Experimentos <i>in vivo</i>	96
5.3.1. <i>Glioma C6 como modelo experimental en el estudio del Glioblastoma Multiforme</i>	96
5.3.2. <i>Caracterización de bordes tumorales por Imagen de Resonancia Magnética</i>	97
5.3.2.1. El ADC como parámetro cuantitativo en la caracterización de los tumores cerebrales	98
5.3.2.2. Transferencia de Magnetización como herramienta diagnóstica adicional	100
5.3.3. <i>Imagen multiparamétrica. Importancia de la delineación de los bordes tumorales</i>	102
6. CONCLUSIONES	105
7. BIBLIOGRAFÍA	108

INDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUCCIÓN	
Figura 1. Frecuencia de resonancia de los protones unidos a biomoléculas (BM) y los protones del agua de solvente	3
Figura 2. Modelos de Transferencia de Magnetización	4
Figura 3. Posibles mecanismos de intercambio de magnetización implicados en la TM	6
Figura 4. Modelo teórico de intercambio de magnetización entre dos sitios según Bloch-McConnell	6
Figura 5. Variación de M_{0A} y T_{1A} del agua (población A) al presaturar los grupos de protones intercambiables de la población de B	9
Figura 6. Espectros z del 5,6-dihidrouracilo	12
Figura 7. Movimiento aleatorio translacional de las moléculas de agua	14
Figura 8. Fundamentos del contraste por transferencia de magnetización	17
Figura 9. Contraste por Transferencia de Magnetización	18
Figura 10. La imagen multiparamétrica investigada en esta tesis comprende el conjunto de secuencias potenciadas en T_1 , T_2 , ADC y %TM	20
MATERIALES Y MÉTODOS	
Figura 11. Estructura del glutathion oxidado	24
Figura 12. Espectro z de una solución modelo de glutathion 1M (pH 4.5, 295K)	29
Figura 13. Diseño y contenido del maniquí diseñado para investigar los efectos de la difusión translacional sobre la transferencia de magnetización en experimentos de imagen en Resonancia Magnética	31
Figura 14. Estados de ionización analizados	32
Figura 15. Implantación estereotóxica de células C6 en cerebro de rata	35
Figura 16. Dispositivo de anestesia con gases fluorados y colocación del animal en el equipo de imagen de RM	36
Figura 17. Secuencias de Imagen de RM empleadas en los experimentos <i>in vivo</i>	40

	Página
Figura 18. Parámetros a tener en cuenta en la adquisición de la imagen por RM ponderadas con diferentes tipos de contraste	41
Figura 19. Procedimiento general para la obtención de mapas paramétricos a partir de imágenes RM en experimentos con maniqués y animales	43
Figura 20. Análisis estadístico. Diseño experimental y proceso estadístico	46
 RESULTADOS	
Figura 21A. Asignación de las resonancias del espectro ^1H -RMN del glutation oxidado (1M en agua, pH 4.5, 295 K). A. Espectro 2D-ge-COSY.	48
Figura 21B. Estructura hiperfina de las señales de los grupos NH y NH_2 del glutation. C. Asignaciones del espectro de ^1H -RM de la molécula del Glutation oxidado a pH 4 y 295K.	49
Figura 22. Titulación de pH de los grupos NH intercambiables del glutation (0.1M, 295K)	50
Figura 23. Espectros z de una solución 1M de glutation a pH's 4, 6.5 y 9 en el intervalo de temperaturas 295-330K	52
Figura 24. Variación de ΔG ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) en función de la temperatura en los intercambios $\text{H}_2\text{O}_{\text{ligada}}-\text{H}_2\text{O}_{\text{libre}}$ (A) y $\text{NH}-\text{H}_2\text{O}$ (B) a pH ácido, neutro y alcalino	54
Figura 25. Numeración utilizada en el cálculo de la energía de interacción entre cada átomo y las moléculas de agua	56
Figura 26. Equilibrio entre el estado protonado y zwitteriónico en disolución acuosa	56
Figura 27. Mapas de Interacción Molecular glutation-agua a diferentes valores de isoenergía de interacción en las dos formas zwitteriónicas B y C	60
Figura 28. Estructura desprotonada de la molécula de glutation en forma zwitteriónica vista desde dos perspectivas	61
Figura 29. Influencia de la microviscosidad en la variación del ADC y % TM para diversas concentraciones de glicerol	63
Figura 30. Variación del ADC, %TM, y T_1 del agua en soluciones de glutation 1M (pH 7.0, $T = 310$ K) en función de la concentración de glicerol (% v/v)	63

	Página
Figura 31. Variación de los espectros z de soluciones de glutathion y glicerol (pH 7.1, $T=310\text{ K}$) manteniendo constante la relación glutathion/agua	64
Figura 32. Variación del ADC, %TM y T_1 en soluciones de glutathion, manteniendo constante la relación glutathion y agua y añadiendo concentraciones crecientes de glicerol a pH 7 y 310K	65
Figura 33. Variación de ADC, T_1 y %TM en el intercambio $\text{NH-H}_2\text{O}$ en disoluciones de Glutathion 1M en ausencia y presencia de 50% Glicerol, a pH 4, 7 y 9 y a temperaturas de 298, 310 y 330K	67
Figura 34. Variación de los espectros z a distintos pH's y temperaturas en presencia y ausencia de 50% de glicerol	68
Figura 35. Mapas paramétricos de T_1 , T_2 , ADC y %TM (a 7T, 22°C), en un maniquí con soluciones de glutathion 1M en ausencia y presencia de diversos agentes viscosizantes agentes	70
Figura 36. Variación a 7T de T_1 , ADC y %TM de soluciones de glutathion 1M y concentraciones crecientes de Glicerol	71
Figura 37. Mapas paramétricos del %TM obtenidos a distintas frecuencias de presaturación	72
Figura 38. Espectros z a 7T de cada una de las disoluciones que componen el maniquí	73
Figura 39. Optimización de los parámetros de la secuencia con Transferencia de Magnetización <i>in vivo</i>	74
Figura 40. Optimización del módulo de TM	75
Figura 41. Mapas paramétricos de T_1 , T_2 , ADC y %TM representativos de cerebro de rata portadora de un glioma C6	77
Figura 42. Variación de T_1 , ADC, T_2 y %TM en las cuatro regiones seleccionadas (necrosis, edema, tumor y región contralateral)	78
Figura 43. Medias marginales estimadas de ADC, T_1 , T_2 y %TM	80
Figura 44. Gráfico de dispersión de los valores de ADC (mm^2/s) frente a los valores de %TM en las cuatro regiones seleccionadas	82
Figura 45. Gráfico de dispersión de los valores de ADC (mm^2/s) frente a los valores de %TM agrupando la necrosis y el edema en una misma región	83

	Página
Figura 46. Gráfico de dispersión de ADC (mm^2/s) frente a %TM correspondiente a las medias de los valores de tumor, edema y tejido sano	84
Figura 47. Cortes histológicos de cerebro de rata. Tinción Hematoxilina – Eosina	86
Figura 48. Estudio paramétrico. Análisis Lineal Discriminante. Obtención de los mapas de probabilidad. Tinción Hematoxilina-Eosina	87
DISCUSION	
Figura 49. Representación logarítmica de las constantes de velocidad de intercambio (k , min^{-1}) de los protones lábiles intercambiables que componen las cadenas polipeptídicas en función del pH	91
Figura 50. Estados de ionización de los grupos que participan en el intercambio de magnetización en el sistema glutation-agua en función del pH investigado	92
Figura 51. Mecanismos implicados en la Transferencia de Magnetización del glutation oxidado con las moléculas de agua circundantes	93

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Parámetros magnéticos de las dos poblaciones de protones que intercambian magnetización en el equilibrio $A \leftrightarrow B$	7
Tabla II. Valores de % TM de diversos compuestos DIACEST y PARACEST	11
Tabla III. Secuencias empleadas en los experimentos de alta resolución 1H RMN	26
Tabla IV. Optimización de la secuencia TM <i>in vivo</i> . Determinación del ancho de banda del pulso y tiempo del módulo de TM	39
Tabla V. Ecuaciones utilizadas en el cálculo de los mapas paramétricos	42
Tabla VI. Cambios de entalpía ΔH y entropía ΔS en los intercambios de transferencia de magnetización $H_2O_{\text{ligada}}-H_2O_{\text{libre}}$ y $NH-H_2O_{\text{libre}}$	53
Tabla VII. Estudio de la energía de interacción con el solvente (en $kJ\ mol^{-1}$) en la molécula de glutation en disolución acuosa	59
Tabla VIII. ADC's del agua en soluciones de Glutation 1M en ausencia (0%) y presencia (50%) de Glicerol	66
Tabla IX. E_a ($kJ.mol^{-1}$) de la difusión translacional del agua pura en soluciones de glutation 1M en presencia y ausencia de glicerol a diversos pH's	66
Tabla X. Pruebas de efectos intra-sujetos	78
Tabla XI. Comparaciones por pares entre regiones	79
Tabla XII. Poder discriminante de los parámetros en el proceso por pasos	81
Tabla XIII. Resultados de la clasificación (%) en las cuatro regiones seleccionadas	82
Tabla XIV. Resultados de la clasificación (%) en la agrupación: necrosis y edema	83
Tabla XV. Resultados de la clasificación (%) de los valores medios de las regiones: tumor, edema y tejido sano	84
TablaXVI. Valores de ADC encontrados en clínica	100
Tabla XVII. Valores de T_2 , ADC y %TM en distintos tipos de Gliomas	103

ABREVIATURAS

AC	Agente de Contraste
ADC	Coeficiente de Difusión Aparente
APT	Amide Proton Transfer
BM	Biomoléculas
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfer (Agentes de Intercambio Químico)
GBM	Glioblastoma Multiforme
IRM	Imagen de Resonancia Magnética
LDA	Análisis Lineal del Discriminante (Linear Discriminant Analysis)
MIF	Mapas de Interacción Molecular (Molecular Interaction Fields)
PFG	Pulsed Field Gradient
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROI	Region de Interés (Region of Interest)
T ₁	Tiempo de relajación longitudinal
T ₂	Tiempo de relajación transversal
TM	Transferencia de Magnetización
TSP	Sal sódica del ácido 2, 2', 3, 3'-tetradeutero-3-trimetilsililpropiónico

1. Introducción

1.1. Fundamentos de Transferencia de Magnetización

1.1.1. Antecedentes

El intercambio de magnetización entre uno o más entornos intra- o intermoleculares constituye uno de los fenómenos más frecuentes en Resonancia Magnética (RM). Los primeros estudios provienen de los años cincuenta cuando se investigaron sus efectos sobre los espectros de RM (Arnold and Packard, 1951; Liddel and Ramsey, 1951; Gutowsky and Saika, 1953; Gutowsky and Holm, 1956; McConnell, 1958; Woessner, 1961; Allerhand and Gutowsky, 1964; Gutowsky *et al.*, 1965). Concretamente, el proceso de la Transferencia de Magnetización (TM) fue descubierto en 1963 por Forsén y Hoffman cuando determinaban la velocidad del intercambio de los protones entre el salicilaldehído y la 2-hidroxiacetofenona (Forsén and Hoffman, 1963; Leibfritz and Dreher, 2001). En los años 70, Edzes y Samulski y más tarde De Boer, propusieron que uno de los mecanismos predominantes en la relajación de los sistemas en interacción se debía a los fenómenos de polarización cruzada entre las dos poblaciones de protones distintas magnéticamente (Edzes and Samulski, 1977; De Boer, 1995). Hasta finales de los ochenta, estas investigaciones se realizaban solamente *in vitro*. Fue en 1989 cuando se adquirieron las primeras imágenes *in vivo* de transferencia de magnetización, en riñón y músculo esquelético (Wolff and Balaban, 1989). Estos autores demostraron que el contraste de la imagen que se generaba al aplicar la TM era específico del tejido y que se debía a un intercambio entre protones móviles y protones unidos a biomoléculas (BM), proporcionando la primera constante de velocidad de este intercambio (Forsén and Hoffman, 1963; Alger and Shulman, 1984; Hsieh and Balaban, 1987; Hsieh and Balaban, 1988; Wolff and Balaban, 1990; Guivel-Scharen *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 2000).

1.1.2. Protones libres y ligados en medio biológico

Para que se produzca el fenómeno de la Transferencia de Magnetización, deben de existir al menos dos poblaciones de protones magnéticamente diferentes intercambiando magnetización entre sí. En los tejidos biológicos estas dos poblaciones se han asociado a:

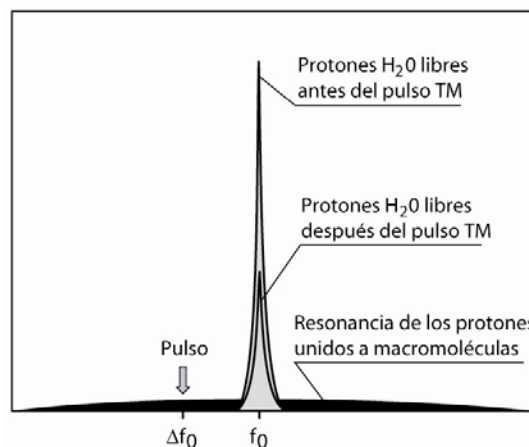
1. Protones intercambiables de los grupos – OH, –NH, –NH₂ de los complejos biomoleculares (BM) y del agua de solvatación circundante. Estos protones forman parte de la estructura molecular de muchos compuestos endógenos (proteínas y ácidos nucleicos) así como de los fosfolípidos que conforman la membrana plasmática de las células

(Liepinsh and Otting, 1996). Se localizan en diversas regiones de la biomolécula o en su esfera de hidratación más próxima adquiriendo en cada caso la dinámica molecular de la biomolécula y por tanto propiedades magnéticas diferenciales. Su señal de ^1H -RM resulta significativamente más ancha que la que producirían en alta resolución soluciones diluidas de los monómeros correspondientes o el agua como solvente, debido, principalmente a la reducida movilidad macromolecular y el valor corto de T_2 resultante.

2. Protones que forman parte de las moléculas del disolvente agua y que se encuentran libres en la solución. Su dinámica no se encuentra limitada por ninguna restricción adquirida como en el caso anterior. De Boer propuso a este respecto, que las moléculas de agua libre y las moléculas unidas a la superficie macromolecular, conocidas como agua de hidratación o solvatación (ó agua superficial) se comportan como una única población al establecerse un intercambio rápido en la escala RMN entre ambas mediado por un fenómeno de difusión (Eng *et al.*, 1991; De Boer, 1995). Al contrario que la población de protones o agua inmovilizada del apartado anterior, la resonancia de los protones de agua libre se observa directamente en el espectro de ^1H -RM como una única y relativamente estrecha señal correspondiente a su T_2 mas prolongado (Leibfritz and Dreher, 2001).

La **Figura 1** muestra esquemáticamente las resonancias correspondientes a la población de los protones libres (estrecha) y ligados a las macromoléculas (ancha). Ambas poblaciones se aproximan al equilibrio termodinámico. La Transferencia de Magnetización entre ellos se produce al aplicar un pulso de presaturación (pulso TM) a uno de ellos normalmente a una frecuencia alejada Δf_0 con respecto a la de Larmor (f_0) del agua libre. En estas condiciones, la magnetización acumulada en el agua ligada se transferirá a la otra población y viceversa, intercambiándose. El resultado de la transferencia de saturación es que la intensidad de la señal del agua libre desciende apreciablemente.

Figura 1. Frecuencia de resonancia de los protones unidos a biomoléculas (BM) y los protones del agua de solvente. La señal en RM de los protones libres se detecta como un pico diferenciado en el espectro mientras que la señal de los protones unidos a BM resulta invisible debido a su reducido T_2 y gran anchura.



1.1.3. Mecanismos implicados en el intercambio de magnetización

En los tejidos biológicos los protones intercambiables pueden encontrarse bien moviéndose libremente o bien formando parte integral de las biomoléculas y como agua de solvatación con movimientos parcialmente restringidos. Estas poblaciones de protones permanecen en equilibrio dinámico, de manera que al saturar o invertir la magnetización de los unos, esta manipulación puede ser transferida a los otros y viceversa. Se han propuesto dos posibles mecanismos para este intercambio de magnetización (**Figura 2**).

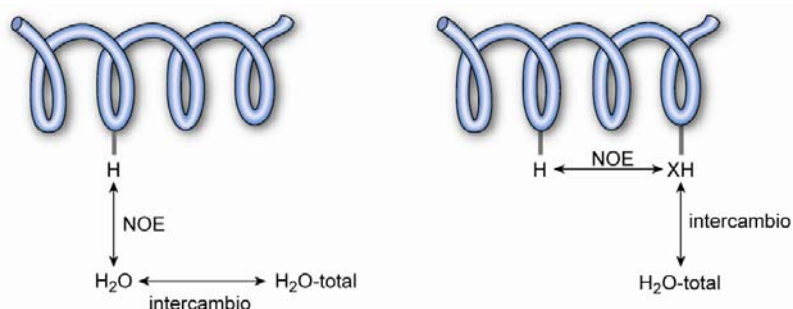


Figura 2. Modelos de Transferencia de Magnetización

Según Liepinsh y Otting, (Liepinsh and Otting, 1996): el primer modelo (**Figura 2, panel izquierdo**) propone que el proceso de la Transferencia de Magnetización entre los protones de la fase macromolecular, el agua de solvatación y el agua del disolvente ocurre mediante el Efecto Nuclear Overhauser (NOE) mediado por interacciones dipolares a corta distancia. De esta manera, la Transferencia de Magnetización ocurriría primero entre los protones intercambiables de la biomolécula y las moléculas de agua de hidratación y después entre éstas y el agua libre del solvente.

En el segundo modelo (**Figura 2, panel derecho**), la TM se produce primero entre los protones de los grupos OH y NH de la fase macromolecular entre sí y después con el agua libre disolvente. Según este mecanismo, el intercambio de magnetización está más favorecido entre los grupos NH y OH de la BM que con el agua de hidratación y disolvente, respectivamente. La velocidad de este intercambio es tan rápida que las señales de los protones intercambiables y del agua coalescen como una única señal debido a que la población de protones del agua excede extraordinariamente a la de la BM. En estas condiciones los valores medidos de los tiempos de relajación del agua constituyen un fiel reflejo del conjunto de protones intercambiables de las BM, proporcionando así, una huella de la composición protónica biomolecular. Aunque se desconoce en la actualidad cuales son los principales mecanismos implicados en la transferencia de magnetización (Liepinsh

and Otting, 1996), diversos estudios han explicado este fenómeno mediante el intercambio de magnetización entre las poblaciones de protones libres y ligados a BM (Forsén and Hoffman, 1963; Edzes and Samulski, 1977; Fung, 1986; Wolff and Balaban, 1989; Kruiskamp and Nicolay, 2001). El intercambio podría ocurrir bien mediante interacciones dipolo-dipolo a través del espacio (cross-polarization) (Wolff and Balaban, 1989; Balaban and Ceckler, 1992; Bryant, 1996; Henkelman *et al.*, 2001), bien a través de un intercambio químico (Chemical Exchange) implicando la transferencia física de los protones o agua entre los dos entornos (Hills, 1992, 1992; Kennan *et al.*, 1996; Liepinsh and Otting, 1996; Gochberg *et al.*, 1998; van Zijl *et al.*, 2003), o bien debido a una combinación de ambos procesos.

La **Figura 3** resume gráficamente los mecanismos de intercambio de magnetización entre los protones de las biomoléculas y los del agua en un tejido biológico idealizado. La velocidad de intercambio químico entre ambas poblaciones depende de diversos factores, incluyendo la solubilidad y la química de los sitios de intercambio, la temperatura, y el pH, así como la formación de puentes de hidrógeno (Gillies *et al.*, 2004; Zhou and van Zijl, 2006) entre otros. En términos más moleculares, estos procesos dependen de los tiempos de correlación rotacional y translacional de los protones en los diferentes entornos, así como de la velocidad de intercambio entre los mismos. En este contexto, la difusión rotacional y translacional del agua y de la biomolécula, deben jugar un papel fundamental en los fenómenos de transferencia de magnetización (Eng *et al.*, 1991). Sin embargo, no existen hasta donde conocemos, estudios apropiados sobre la relación entre difusión rotacional o translacional y transferencia de magnetización. En esta Tesis abordamos las bases moleculares de los fenómenos de transferencia de magnetización incluyendo su dependencia de la temperatura, pH y microviscosidad o difusión rotacional y translacional local.

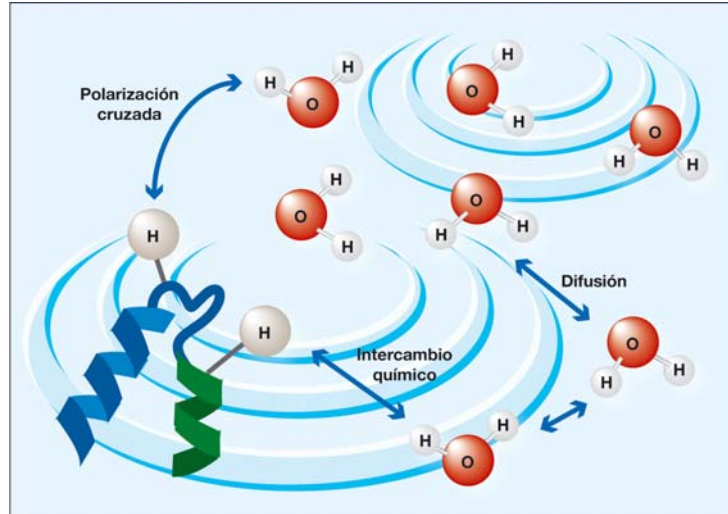
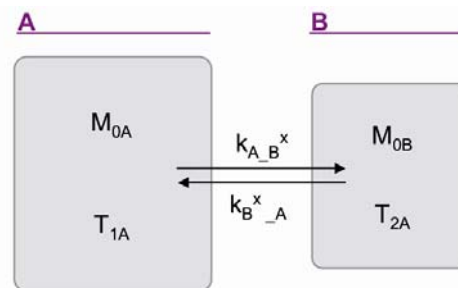


Figura 3. Posibles mecanismos de intercambio de magnetización implicados en la TM. La Transferencia de Magnetización puede producirse por un mecanismo de intercambio físico de protones (Chemical Exchange) o por un mecanismo de intercambio de magnetización mediado por interacciones dipolo-dipolo a corta distancia (Cross Polarization). Ambos intercambios están mediados por la difusión translacional y rotacional de las biomoléculas y del agua.

1.1.4. Interpretación cinética del intercambio. Ecuaciones de Bloch

El formalismo clásico de Bloch y McConnell describe el intercambio químico entre dos poblaciones de protones con distinto comportamiento magnético en función de las propiedades magnéticas de cada sitio (McConnell, 1958; Bradley and Bydder, 1997). En este formalismo, las dos poblaciones se encuentran en un estado próximo al equilibrio termodinámico intercambiando magnetización de manera reversible. Las ecuaciones de Bloch y McConnell (**Figura 4**) caracterizan el intercambio entre los dos sitios: A (agua) y B (biomolécula) en función de la magnetización en equilibrio de ambos M_{0A} y M_{0B} de sus valores de T_1 , T_{1A} y T_{1B} antes del intercambio y de las constantes de velocidad de las reacciones directa e inversa K_{AB} y K_{BA} (Zhou *et al.*, 2004).

Figura 4. Modelo teórico de intercambio de magnetización entre dos sitios según Bloch-McConnell



La **Tabla I** resume generalmente los parámetros magnéticos más característicos de cada población (Bradley and Bydder, 1997).

Tabla I
Parámetros magnéticos de las dos poblaciones de protones
que intercambian magnetización en el equilibrio $A \leftrightarrow B$

	H libres (A) visibles a RM	H unidos (B), invisibles a RM
Picos de resonancia	Estrechos (10-100 Hz)	Muy anchos (10000-50000 Hz)
T_2	>10-100 ms	< 1 ms
Magnetización longitudinal	M_A	M_B
Magnetización longitudinal sin saturación	M_{0A}	M_{0B}
Magnetización longitudinal con saturación	M_{Asat}	0
T_1 en ausencia de intercambio	T_{1A}	T_{1B}
Cte. de velocidad para la relajación intrínseca	$k_A=1/T_{1A}$	$k_B=1/T_{1B}$
Tiempo de residencia	τ_A	τ_B
Cte. de velocidad en la TM	$k_{A \rightarrow B}^x = 1/\tau_A$	$k_B^x \rightarrow A = 1/\tau_B$
Magnetización intercambiada por unidad de tiempo	$M_A k_{A \rightarrow B}^x = M_A/\tau_A$	$M_B k_B^x \rightarrow A = M_B/\tau_B$
T_1 observado sin saturación	T_{1obs}	-
T_1 observado al aplicar saturación	T_{1sat}	

En este trabajo hemos investigado en detalle los mecanismos de la Transferencia de Magnetización entre los grupos intercambiables de un péptido modelo como es el glutatión oxidado y el agua circundante. En los siguientes párrafos, la población de protones de las moléculas de agua se define como grupo A y la población de protones de los grupos NH del glutatión oxidado se denomina grupo B^X , donde x indica cada uno de sus grupos intercambiables. Más concretamente, 1 representa al grupo –NH de la glicina, 2 al grupo –NH de la cisteína, y 3 al grupo –NH₂ del glutámico.

En los dos sistemas en ausencia de intercambio cada población de protones viene definida por una serie de parámetros que reflejan su equilibrio termodinámico de magnetización (**Tabla I**). Sin embargo, la aplicación de un pulso de presaturación modifica la población y propiedades magnéticas de ambos sitios debido al intercambio de magnetización hasta que se alcanza un nuevo estado de equilibrio compatible con el intercambio. Se puede definir teóricamente, la cinética de magnetización de A después de un pulso de presaturación en B según las expresiones:

$$\frac{dM_A}{dt} = (M_{0A} - M_A)k_A - M_A k_{A \rightarrow B^x} + M_B k_{B^x \rightarrow A} \quad [1]$$

$$\frac{dM_A}{dt} = \frac{M_{0A} - M_A}{T_{1A}} - \frac{M_A}{\tau_A} + \frac{M_B}{\tau_B} \quad [2]$$

En estas condiciones, la saturación de los grupos B^x induce una pérdida de magnetización sobre la población de A, debida tanto a la transferencia de magnetización desde A a B^x ($M_{A \rightarrow B^x} = M_A/\tau_A$) como desde B^x a A ($M_{B^x \rightarrow A} = M_B/\tau_B$). En el estado estacionario y cuando se alcanza el equilibrio, $dM_A/dt = 0$, si se mantiene la resonancia de B saturada ($M_B = 0$), se produce una nueva situación en donde la magnetización de A se puede expresar como:

$$\frac{dM_A}{dt} = \frac{M_{0A}}{T_1} - \frac{M_A}{T_1} - \frac{M_A}{\tau_A} = \frac{M_{0A}}{T_1} - \frac{M_A}{\tau_A} \quad [3]$$

$$\frac{1}{\tau_{1A}} = \frac{1}{T_1} + \frac{1}{\tau_A} \quad [4]$$

Donde los diversos parámetros tiene la significación descrita en la **Tabla I**.

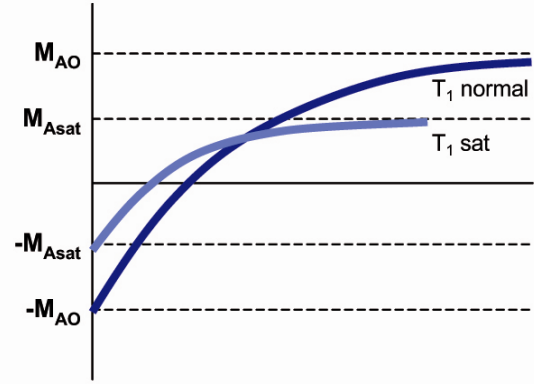
Integrando con respecto al tiempo, se puede expresar la magnetización de A en función de los tiempos de relajación determinados experimentalmente (Santoro and Bruix, 2005),

$$M_{A(t)} = M_{0A} \left[\frac{\tau_{1A}}{T_1} + \left(1 - \frac{\tau_{1A}}{T_1} \right) e^{-t/\tau_{1A}} \right] \quad [5]$$

La magnetización de A con respecto al tiempo disminuye exponencialmente con una velocidad $1/\tau_{1A}$ y en el equilibrio alcanza unos valores determinados por $M_{0A}\tau_{1A}/T_1$ (McConnell, 1958; Forsén and Hoffman, 1963; Leijon, 1996; Spencer and Fishbein, 2000; Woessner *et al.*, 2005). De esta manera aplicando un pulso de presaturación de duración creciente sobre una población de protones intercambiables, la magnetización longitudinal de equilibrio M_{0A} se reduce exponencialmente a una nueva magnetización (M_{Asat}) con una constante de tiempo de relajación (T_{1sat}) inferior al T_1 de A obtenido en ausencia de saturación. Resumiendo (Kiortsis *et al.*),

- El T_1 observado de la población A en ausencia de intercambio, disminuirá su valor a T_{1sat} cuando se aplique la saturación sobre la población de protones B.
- La señal de los protones visibles A que normalmente están completamente relajados M_{0A} , se reducirá a M_{Asat} con la constante de tiempo T_{1sat} .

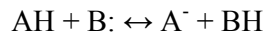
Figura 5. Variación de M_{0A} y T_{1A} del agua (población A) al presaturar los grupos de protones intercambiables de la población de B. La saturación de B induce una disminución del tiempo de relajación longitudinal de A que en estas condiciones requiere menos tiempo para recuperar su equilibrio



Sin embargo, el formalismo de Bloch-McConnell anteriormente expuesto no contempla la influencia de factores microambientales, como el pH, la microviscosidad o la difusión translacional los cuales constituyen variables fundamentales en el medio biológico. Este trabajo proporciona una investigación detallada de estos aspectos.

1.1.5. Transferencia de Magnetización y pH. Agentes de contraste extrínseco CEST. Contraste intrínseco Amide Proton Transfer (APT)

Como se ha indicado en las secciones anteriores, la transferencia de magnetización está asociada al intercambio de protones entre dos sitios magnéticamente diferentes. Esto permite predecir que en el caso de grupos ionizables resulte dependiente además de los factores indicados con anterioridad del estado de ionización de los sitios (pK_a 's) y del pH. Así, en la ecuación general ácido-base:



la saturación sobre A provoca un cambio sobre la población de B debido a la transferencia del protón AH^+ y viceversa. Esta transferencia depende del pH, dado que éste determina al estado de ionización relativa de los dos sitios de intercambio (Ward and Balaban, 2000; Zhou and van Zijl, 2006). De esta manera, se puede inducir contraste por TM dependiente del pH extrínsecamente empleando agentes CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer), (Ward and Balaban, 2000) o intrínsecamente, utilizando diversos componentes endógenos del tejido que incluyen principalmente lípidos y proteínas (Wolff and Balaban, 1989; Balaban and Ceckler, 1992; Bryant, 1996; Henkelman *et al.*, 2001).

1.1.5.1. Agentes CEST

Se han propuesto diversos compuestos diamagnéticos de síntesis o agentes DIACEST que presentan grupos ionizables cuyo intercambio de magnetización con el agua circundante es dependiente del pH. Estos compuestos permiten observar disminuciones en la intensidad de la señal del agua en imágenes de RM, después de un pulso de presaturación sobre el protón intercambiable del compuesto (Caravan *et al.*, 1999). La caracterización del efecto CEST fue desarrollada inicialmente por Ward, Aletras y Balaban (Ward *et al.*, 2000). Posteriormente, el grupo de van Zijl (Goffeney *et al.*, 2001; Snoussi *et al.*, 2003) estudió el aumento en la especificidad y eficacia del intercambio empleando macromoléculas que poseyesen un gran número de sitios de intercambio con similares desplazamientos químicos, como la poli-L-lisina, el ácido poliuridílico (poli(rU)) y algunos dendrímeros (Snoussi *et al.*, 2003). Casi simultáneamente Sherry (Zhang *et al.*, 2001; Zhang and Sherry, 2003) y Aime (Aime *et al.*, 2002) investigaron una nueva generación de agentes CEST paramagnéticos (PARACEST) donde la frecuencia de los sitios de intercambio estaba más alejada en desplazamiento químico (aproximadamente 50 ppm) con respecto a la resonancia del agua. La **Tabla II** recoge algunos de los compuestos investigados. Para que un compuesto sea considerado como agente CEST, el protón intercambiable debe tener un desplazamiento químico ($\Delta\delta_A$) superior a 2 ppm con respecto a la resonancia del agua (Ward *et al.*, 2000). Esto evitará la saturación directa del agua al aplicar el pulso de presaturación y minimiza los problemas derivados de la heterogeneidad de susceptibilidad magnética del medio biológico (Guivel-Scharen *et al.*, 1998). La especificidad del efecto del agente CEST viene determinada por la relación $\Delta\delta/k_{AC} > 1$, donde k_{AC} es la constante de velocidad del intercambio del agente CEST entre ambas poblaciones de protones (Wüthrich, 1986; Liepinsh and Otting, 1996), dependiente también de la temperatura y el entorno iónico del medio (Liepinsh and Otting, 1996).

Tabla II
Valores de %TM de diversos compuestos DIACEST y PARACEST

COMPUESTO	[] mM	Grupo Funcional	ppm ⁽¹⁾	pH	M _s /M ₀	M ₀ -M _s (%) ⁽²⁾
Azúcares						
		Protones hidroxilo (-OH)				
Manitol	250	-OH	1	7	0.89	9 ^(a)
Dextrano	2	-OH	1.5	7	0.76	18.9 ^(a)
Aminoácidos						
		Protones amino (-NH ₂)				
L-Alanina	125	-NH ₂	3	4	0.36	67.4 ^(a)
L-Arginina	125	-NH ₂	3	4	0.36	65.8 ^(a)
L-Arginina	125	Protones guanidinio	2	5	0.33	57.7 ^(a)
L-Glutamina	125	-NH ₂	2	5.2	0.7	27.6 ^(a)
L-Triptófano	35	-NH ₂	2	6.5	0.89	12.2 ^(a)
5-Hidroxitriptófano	62.5	-NH ₂	2.83	4	0.57	41.6 ^(a)
		Anillo indol (-NH)	5.33	8	0.79	21.2 ^(a)
Deriv. Nucleósidos						
		Protones base (-NH)				
5,6-Dihidrouracilo	62.5	3-NH	5	6	0.78	22.2 ^(a)
5,6-Dihidrouracilo	62.5	2-NH	2.67	7	0.77	22.2 ^(a)
Uridina	125	3-NH	6.33	4	0.65	34.7 ^(a)
Timidina	125	3-NH	6.33	5	0.65	34.8 ^(a)
Deriv. Ác. Barbitúrico						
		Anillo de Pirimidina (-NH)				
Ácido Barbitúrico	62.5	-NH	5	6.5	0.68	32.5 ^(a)
Ácido 2-tiobarbitúrico	62.5	-NH	6.33	5	0.65	35.3 ^(a)
Imidazol y deriv.						
2-Imidazolidona	62.5	Protones del anillo (-NH)	1.17	5	0.68	30.4 ^(a)
2-Imidazolidinetiona	62.5	Protones del anillo (-NH)	2.83	3	0.64	36.7 ^(a)
Proteínas y otros polímeros						
Poli-L-Lisina		Protones amida	3.5	7.3-7.4		43 ^(b)
Dendrimeros		Protones amida	3.5	7.3-7.4		51 ^(b)
Poli (rU)		Protones imino	6.1			13-72 ^(c)
Compuestos de Lantánidos						
Yb-DOTAM-Gly		Protones amida	-16			68 ^(d)
Yb-DOTA-4AmCE		Agua unida	200			No efecto ^(e)

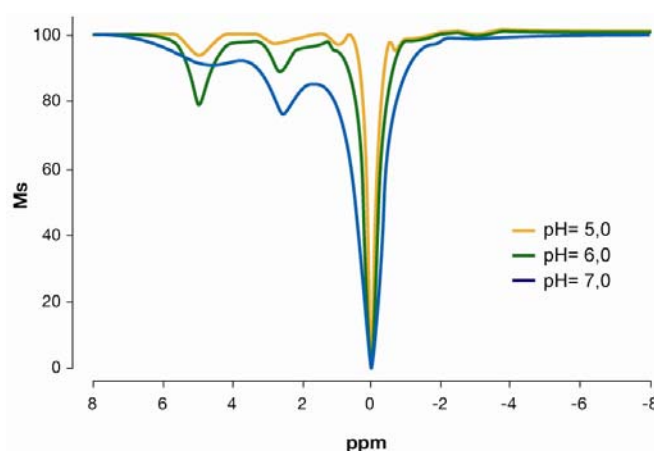
⁽¹⁾ Con respecto a la resonancia del agua ⁽²⁾ El efecto CEST depende de la concentración del soluto, del pH, temperatura, intensidad del campo, y de la potencia empleada en la presaturación

^(a) (Ward *et al.*, 2000) ^(b) (Goffeney *et al.*, 2001) ^(c) (Snoussi *et al.*, 2003) ^(d) (Aime *et al.*, 2002) ^(e) (Zhang and Sherry, 2003)

A pesar de la elegancia del abordaje CEST, los compuestos utilizados presentan dos limitaciones importantes que han impedido hasta ahora su desarrollo posterior. En primer lugar, el efecto TM observado depende no solo del pH del entorno, sino de la concentración local del agente. Esto hace muy difícil distinguir en una imagen RM, el verdadero origen del contraste observado. Para evitar este inconveniente, Balaban propuso

la utilización de agentes CEST con dos o mas sitios de intercambio, de manera que la relación entre los intercambios de ambos sitios, resultase independiente de la concentración del agente. Este abordaje se observa más claramente en la **Figura 6**, que muestra un espectro z del 5,6 dihidrouracilo, el cual contiene dos sitios de intercambio con diferente pK_a y diferente comportamiento TM frente al pH. Es posible obtener medidas del pH, obviando la influencia de la concentración del compuesto y empleando la relación de intensidades del agua obtenidas al presaturar en los dos sitios de intercambio del 5,6 dihidrouracilo.

Figura 6. Espectros z del 5,6-dihidrouracilo. La concentración empleada en el experimento fue de 62.5 mM con 20mM de tampón fosfato a pH's 5.0, 6.0 y 7.0 a 37°C (Ward *et al.*, 2000)



En segundo lugar el escaso número de sitios de intercambio por agente CEST hace que resulte necesario que para observar el efecto CEST con una resolución espacial apreciable se administren dosis muy elevadas (>100 mM en algunos casos de la **Tabla II**). Recientemente se ha abordado esta limitación administrando macromoléculas exógenas (como la poli-lisina) o dendrímeros con un elevado número de sitios de intercambio, lo que permite reducir significativamente la dosis. Una extensión de esta metodología consiste en emplear los múltiples sitios de intercambio presentes en macromoléculas endógenas, como los enlaces peptídicos de las proteínas que constituyen el tejido (Amide Proton Transfer, APT). La sección siguiente describe con más detalle este procedimiento.

1.1.5.2. Contraste intrínseco de la imagen por APT

La segunda forma de generar contraste por Transferencia de Magnetización es explotar las propiedades magnéticas intrínsecas que poseen los protones intercambiables de las biomoléculas presentes en el tejido (Mori *et al.*, 1998; Chen and Hu, 1999; van Zijl *et al.*, 2003). Los primeros experimentos *in vivo* se llevaron a cabo en cerebro de rata por

Zhou (Zhou *et al.*, 2003). Sin embargo, en la mayor parte de los casos, se emplean los grupos amida de los enlaces peptídicos de las proteínas, en lo que se conoce como APT (Amide Proton Transfer) (Henkelman *et al.*, 2001; Agre, 2004; Stanisiz *et al.*, 2005). La principal diferencia entre la imagen por TM y la imagen por APT radica en los efectos específicos provocados por la saturación, el mecanismo por el que se produce la transferencia de saturación, y la apariencia más o menos simétrica de la imagen de TM convencional con respecto a la resonancia del agua. Se piensa que los efectos que origina la técnica de APT sobre las moléculas móviles dependen puramente del intercambio químico, mientras que en la imagen de TM dependen parcialmente del intercambio químico (Zhou and van Zijl, 2006). En la técnica APT, se aplica el pulso(s) de presaturación sobre los hidrógenos de los grupos amida de las proteínas con desplazamiento químico de alrededor de 3.5 ppm con respecto a la resonancia del agua (Mori *et al.*, 1998). En los agentes CEST la concentración del compuesto es crucial para producir y observar el intercambio de magnetización. Sin embargo, en esta técnica, aunque el rango de concentración del “pool” de protones amido es del orden de mM, el empleo de un tren de pulsos de presaturación sobre estos protones, provoca una disminución muy apreciable de la señal del agua (% TM) similar a la imagen obtenida por agentes CEST empleados a una concentración muy superior (van Zijl *et al.*, 2003).

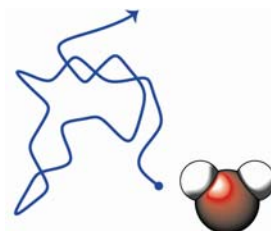
A pesar del elevado número de compuestos CEST y PARACEST disponibles, no se conocen con precisión los fundamentos moleculares y termodinámicos de este tipo de contraste ni de su dependencia del pH o de la microviscosidad. Estos aspectos resultan esenciales para comprender la base molecular de este tipo de contraste RM y proporcionar interpretaciones objetivas de los efectos observados en las imágenes. En este trabajo se abordan estas cuestiones, empleando el dipéptido glutation como sistema modelo. Más particularmente, el presente trabajo investiga la dependencia del pH de la velocidad de intercambio de los protones NH del péptido modelo con el agua y sus determinantes cinéticos y termodinámicos.

1.1.6. Transferencia de Magnetización y difusión molecular rotacional y translacional

El fenómeno de la difusión se define como el movimiento espontáneo (o Browniano) de iones ó moléculas debido a su energía térmica interna. Este proceso juega un papel fundamental en todas las reacciones químicas ya que las especies reactantes deben de colisionar necesariamente antes de que la reacción se produzca (Marshall, 1978). Esta

consideración se aplica también a los procesos de transferencia de magnetización ya que los núcleos involucrados deben aproximarse y permanecer interaccionando suficiente tiempo para que se pueda producir la transferencia. La **Figura 7** muestra el movimiento aleatorio de una molécula de agua a lo largo del espacio en un periodo de tiempo similar a su tiempo de correlación rotacional. En estas condiciones, su velocidad neta de translación, depende de los obstáculos o restricciones que encuentre en su trayectoria durante el movimiento estadístico de translación.

Figura 7. Movimiento aleatorio translacional de las moléculas de agua



Este proceso viene determinado por dos componentes: el rotacional y el translacional. El empleo de la espectroscopía de RM en estudios de difusión proporciona una potente herramienta para estudiar estos procesos. Los tiempos de correlación rotacional se pueden calcular a partir de medidas de tiempos de relajación longitudinales T_1 mediante la ecuación de Solomon-Bloembergen. Para medir el desplazamiento translacional se pueden emplear secuencias que aplican gradientes de pulso (método PFG) para determinar el desplazamiento translacional (Moonen *et al.*, 1992; Hawlicka, 1995; Nicolay *et al.*, 2001; Cabrita and Berger, 2002). El experimento DOSY (Difusión Ordered Spectroscopy) en alta resolución, permite determinar simultáneamente el coeficiente de difusión translacional de los diversos componentes de una mezcla, representando bidimensionalmente los coeficientes de difusión observados frente al desplazamiento químico de cada resonancia (Ferrage *et al.*, 2003).

1.2. Imagen por Resonancia Magnética

1.2.1. Fundamentos del contraste por Imagen de RM. Papel de la Transferencia de Magnetización y la Difusión

1.2.1.1. Características generales del contraste en imágenes por Resonancia Magnética

Conviene ahora, antes de presentar en más detalle el contraste por Transferencia de Magnetización, describir brevemente los diversos factores que contribuyen al contraste general en las imágenes de Resonancia Magnética. La Resonancia Magnética permite obtener imágenes de la distribución y propiedades del agua de los tejidos (Lauterbur, 1973;

Mansfield and Pykett, 1978). La cantidad y propiedades de relajación de los protones del agua en los diferentes vóxeles del objeto, constituyen la base del contraste en Imagen por Resonancia Magnética (Wolff and Balaban, 1989). La intensidad de la señal de resonancia en cada píxel está definida por la cantidad de agua presente en el vóxel original (N), por el tiempo de relajación longitudinal T_1 , el tiempo de relajación transversal T_2 y por dos parámetros instrumentales, el tiempo de repetición TR y el tiempo de eco TE (Yoshikawa *et al.*, 1985; Morris, 1986; Crooks, 1988; Westbrook, 1993; Lufkin, 1998) según la expresión:

$$I_i = N \cdot f(v) \cdot (1 - e^{-TR/T_1}) \cdot e^{-TE/T_2} \quad [6]$$

donde $f(v)$ es un factor de flujo que corrige la intensidad calculada para aquellos espines que abandonan el vóxel observado durante la adquisición debido a fenómenos de difusión o perfusión. La expresión [6] indica que en una imagen eco de espín, no es posible observar exclusivamente los efectos de T_1 sin observar contaminaciones de los efectos de T_2 y viceversa. Para obtener imágenes ponderadas en T_1 se emplean valores de TR cortos y valores de TE muy cortos ($TE \ll T_2$), para ponderar en T_2 se aumenta la contribución relativa de este parámetro empleando valores de TE y TR largos y para ponderar en densidad protónica se aumentará la contribución de la densidad protónica empleando valores de TE cortos y TR muy largos ($TR > 5T_1$). El contraste entre dos puntos I_{imagen} (píxeles 1 y 2) viene definido como la diferencia de intensidad entre dos píxeles de la imagen $I_2 - I_1$, y se produce principalmente por las propiedades magnéticas diferentes de cada uno de ellos (densidad nuclear N_1, N_2 y relajación magnética $T_{11}, T_{21}, T_{12}, T_{22}$).

$$I_{imagen} = \frac{|I_2 - I_1|}{|I_2 + I_1|} \quad [7]$$

Es posible ponderar las imágenes de Resonancia Magnética con información suplementaria a los valores de T_1 y T_2 . En particular, en esta Tesis se han utilizado los pesajes en Difusión y en Transferencia de Magnetización, evaluando la importancia relativa de ambos tanto *in vitro* como *in vivo*. A continuación se describen brevemente los fundamentos de la imagen de difusión y de la de Transferencia de Magnetización.

1.2.1.2. Imagen pesada en Difusión

La imagen de Resonancia Magnética pesada en difusión se ha consolidado recientemente como una potente herramienta que proporciona información sobre el movimiento translacional del agua tisular y su intercambio entre diversos compartimentos intra- y extracelulares del tejido (Chien *et al.*, 1992). En este tipo de imágenes las regiones que presentan un coeficiente de difusión aparente (ADC) elevado, muestran una atenuación importante de la señal, mientras que las regiones con ADC menores se caracterizan por una disminución más moderada de la señal (Bouzier *et al.*). Esto se traduce en la imagen en zonas de hipointensidad, correspondientes a altos ADC's y zonas de hiperintensidad, derivadas de bajos ADC's. La difusividad translacional del agua se mide con el coeficiente de difusión aparente (ADC), a través de la ecuación de Stejskal-Tanner. Con los valores de ADC calculados en cada píxel se generan los correspondientes mapas de ADC que proporcionan información cuantitativa sobre las restricciones translacionales de la molécula de agua a su paso por diferentes regiones o tejidos. Estos valores de ADC representan la media ponderada de los ADC's de los diversos compartimentos intracelulares, extracelulares y vasculares del tejido visitados por la molécula de agua durante el tiempo de difusión (Δ).

1.2.1.3. Imagen pesada en Transferencia de Magnetización

La adquisición de imágenes potenciadas en Transferencia de Magnetización proporciona un método cuantitativo para evaluar las propiedades del intercambio químico entre dos poblaciones de agua libre y ligada en los tejidos. Como se ha indicado anteriormente (sección 1.1.2.) el procedimiento se basa en la aplicación de un pulso selectivo de presaturación sobre la población de protones inmovilizados y la monitorización de la magnetización transferida a la población de protones libres, mediante imagen de Resonancia Magnética convencional. El contraste de la imagen obtenida es función de la concentración de protones intercambiables en cada sitio y de la velocidad del intercambio de magnetización entre ambos (Wolff and Balaban, 1989; Henkelman *et al.*, 1993; De Boer, 1995; Henkelman *et al.*, 2001). Esta técnica es ampliamente utilizada en el diagnóstico de una gran variedad de patologías, principalmente en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la Esclerosis Múltiple en las que se produce una disminución del contenido de mielina en los tejidos enfermos y por tanto del “pool” de agua ligada (Grossman, 1994; Grossman *et al.*, 1994; Wolff and Balaban, 1994;

Vonarbourg *et al.*, 2004). La **Figura 8** muestra un modelo hipotético que permite entender mejor este fenómeno. En particular, se muestra un tejido constituido por un “pool” de cuatro moléculas de agua libre y tres unidas a las biomoléculas (BM). Los protones de las moléculas de agua unidas a biomoléculas presentan valores de T_2 extremadamente cortos, lo que impide su detección empleando técnicas estándar de imagen de RM. Por tanto, la señal recogida en la imagen proviene de la población de protones de agua libre. En el esquema, la flecha hacia arriba refleja la unidad de señal medida por RM para el “pool” de movimiento libre, mientras que la flecha hacia abajo refleja intensidad nula derivada de los protones inmovilizados, invisibles a la imagen por Resonancia Magnética. Ambas poblaciones pueden intercambiar su magnetización según las ecuaciones de Bloch. En el modelo de la figura, antes de aplicar la presaturación, la relación señal/ ruido (S/R) es igual a cuatro (unidades arbitrarias). Esta señal corresponde tan solo a los protones de agua libre, ya que los protones con movimiento restringido no contribuyen a la relación S/R de este tejido. El pulso de presaturación se aplica sobre los protones macromoleculares sin afectar directamente a los cuatro espines del “pool” de movimiento libre. Instantáneamente después de la presaturación, puede comenzar a visualizarse el intercambio de magnetización desde el “pool” ligado al libre. En nuestro modelo, el resultado de esta transferencia se ve reflejado sobre la población del agua donde la relación S/R disminuye a dos. Al mantener la saturación sobre el “pool” biomolecular durante un tiempo (Kiortsis *et al.*), se crea una nueva situación de equilibrio, donde el tiempo de relajación longitudinal aparente T_{1sat} del tejido se acorta con respecto al T_1 normal (**Figura 5**).

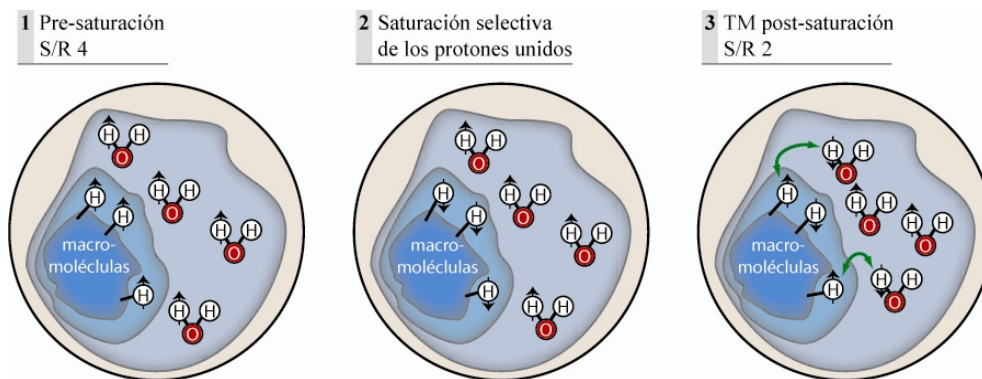
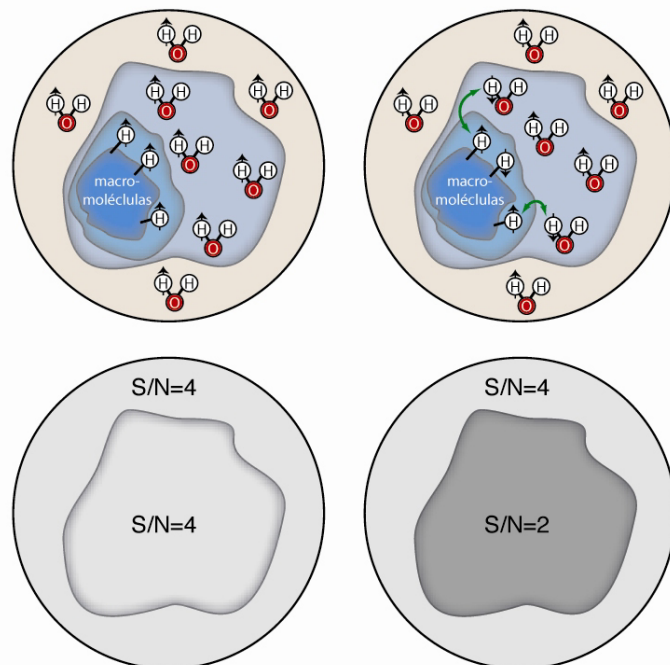


Figura 8. Fundamentos del contraste por transferencia de magnetización. En el modelo, la señal medible en imagen de RM se recoge de los protones del agua libre del tejido. Al aplicar la saturación sobre los protones unidos a la BM, se produce un intercambio de magnetización entre ambas poblaciones. Como consecuencia, la magnetización sobre la población de agua libre se ve afectada disminuyendo su señal, que ahora contiene sólo aquellos protones que no han intercambiado su magnetización.

La generación del contraste por Transferencia de Magnetización en imagen por Resonancia Magnética se ilustra en la **Figura 9**. En este modelo se asume que los tiempos de relajación de las moléculas de agua libre tiene el mismo valor en ambos tejidos y que sólo difieren en la concentración de protones macromoleculares capaces de intercambiar magnetización con los protones de agua libre. El tejido externo posee cuatro moléculas de agua libre con cuatro espines, y el tejido interno contiene un “pool” de cuatro moléculas de agua libre (visibles a RM, como en el tejido externo) y otro de movimiento restringido cuya señal procedente de estos protones es invisible. Antes de aplicar la saturación, ambos tejidos tienen una relación $S/R=4$ (unidades arbitrarias) con lo que no pueden ser diferenciados por los métodos convencionales de contraste. Sin embargo, al aplicar selectivamente la presaturación sobre los protones macromoleculares se produce un cambio en la relación S/R del tejido interno reduciéndose su señal/ruido a dos como resultado de la transferencia de su magnetización a las moléculas de agua libre. Otro tejido sin protones intercambiables (o con diferente cantidad de los mismos) no se vería afectado ($S/R=4$) (o lo haría en diferente proporción), ya que no puede transferir su magnetización con ningún protón inmóvil e intercambiable o lo haría con diferente velocidad. Como consecuencia, en la nueva situación de equilibrio se genera un contraste entre dos tejidos denominado Contraste por Transferencia de Magnetización (MTC) siendo mayor al aumentar el contenido de protones intercambiables dentro de un mismo tejido.

Figura 9. Contraste por Transferencia de Magnetización.

La TM puede aumentar el contraste entre tejidos. Las imágenes de la izquierda representan la fase anterior al contraste de Transferencia de Magnetización y las de la derecha tras aplicar la saturación. Las imágenes de los paneles superiores muestran el contenido de los espines libres y ligados en ambos tejidos. Las figuras de los paneles inferiores, representan en escala de grises el contraste generado en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) del pulso de TM en la secuencia.



1.3. Imagen multiparamétrica. Aplicación *in vivo* de la Transferencia de Magnetización como herramienta para la delimitación de los bordes tumorales

Una de las principales ventajas de la imagen por RM sobre las otras modalidades de imagen diagnóstica es la posibilidad de obtener información sobre los tejidos blandos de manera no invasiva, permitiendo además una gran versatilidad en la variación del contraste de la imagen mediante la modificación de los parámetros de adquisición. Las secuencias más frecuentemente utilizadas en clínica son aquellas que explotan las diferencias de contraste entre tejidos normales y patológicos debido a su diferente densidad de espines (ρ) o tiempos de relajación (T_1 o T_2) (De Boer, 1995). Existen mecanismos adicionales de contraste RM basados en la susceptibilidad magnética, la transferencia de magnetización, el desplazamiento químico, la difusión, la perfusión, el flujo sanguíneo, y el uso de agentes de contraste endógenos y exógenos que pueden utilizarse para generar contraste debido a propiedades más específicas de los tejidos (Scherzinger and Hendee, 1985; Nitz and Reimer, 1999). Muchas veces resulta necesario obtener imágenes con pesaje en diversos tipos de contraste, dejando al experto la tarea de seleccionar el tipo de contraste a utilizar y el procedimiento más apropiado de comparación de las imágenes. Sin embargo, los procedimientos estadísticos de imagen multiparamétrica (Back *et al.*, 2003) permiten realizar estas tareas de manera automática y cuantitativa, independientemente del experto y proporcionando criterios objetivos de clasificación de las zonas patológicas.

Una de las patologías más investigadas en Resonancia Magnética diagnóstica, es el cáncer. Entre los aspectos más importantes en este terreno destaca la delimitación precisa de los límites del tumor con la zona circundante de edema y tejido sano. Esta delimitación resulta crucial a la hora de diseñar la zona de impacto de la radioterapia o la zona de resección en cirugía. Desde que Damadian describió que los tiempos de relajación de los tumores eran diferentes a los de los tejidos normales (Damadian, 1971), se han empleado tradicionalmente con este objeto, secuencias de imagen ponderadas en T_2 o T_1 (con agentes de contraste) (Yoshikawa *et al.*, 1985; Parizel *et al.*, 1989; Wolff and Balaban, 1989; Kurki *et al.*, 1992 ; Wilmes *et al.*, 1993; Steen *et al.*, 1994; Caravan *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000). También se han empleado pesajes en difusión (Krabbe *et al.*, 1977; Tsuruda *et al.*, 1991; Eis *et al.*, 1994; Tien *et al.*, 1994; Brunberg *et al.*, 1995; Els *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1996; Chenevert *et al.*, 1997; Sugahara *et al.*, 1999; Pronin *et al.*, 2000;

Castillo *et al.*, 2001; Stadnik *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2002; Herneth *et al.*, 2003; Bennett *et al.*, 2004; Hein *et al.*, 2004; Pauleit *et al.*, 2004; Provenzale *et al.*, 2004 ; Asao *et al.*, 2005; Mascalchi *et al.*, 2005) o en transferencia de magnetización (Wolff and Balaban, 1989; Balaban and Ceckler, 1992; Lundbom, 1992; Grossman *et al.*, 1994; Wolff and Balaban, 1994 ; Quesson *et al.*, 1997; Peretti-Viton *et al.*, 1998; Roell *et al.*, 1998 ; Okumura *et al.*, 1999; Pui, 2000; Henkelman *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003; Neufeld *et al.*, 2003 ; Sled *et al.*, 2004; Xydis *et al.*, 2006). Sin embargo, las imágenes con un pesaje definido por un solo parámetro T_1 o T_2 revelan límites aparentemente diferentes entre la lesión, su zona edematosa circundante y el tejido normal. En este estudio investigamos cuantitativamente las interacciones entre los diversos pesajes, incluyendo principalmente la Transferencia de Magnetización y desarrollamos un método de imagen multiparamétrica que permite seleccionar la mejor combinación de parámetros o pesajes que discriminan entre diversos tejidos normales, zonas de edema y tumor. La **Figura 10** resume la información que proporciona cada tipo de pesaje, un aspecto fundamental para interpretar correctamente el resultado de las imágenes mono- o multiparamétricas (Rajan *et al.*, 1990; Eis *et al.*, 1995; Kurki *et al.*, 1995; Ikezaki *et al.*, 1997; Raila *et al.*, 1999; Lemaire *et al.*, 2000; Bulakbasi *et al.*, 2003; Vonarbourg *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2005; Stanisiz *et al.*, 2005).

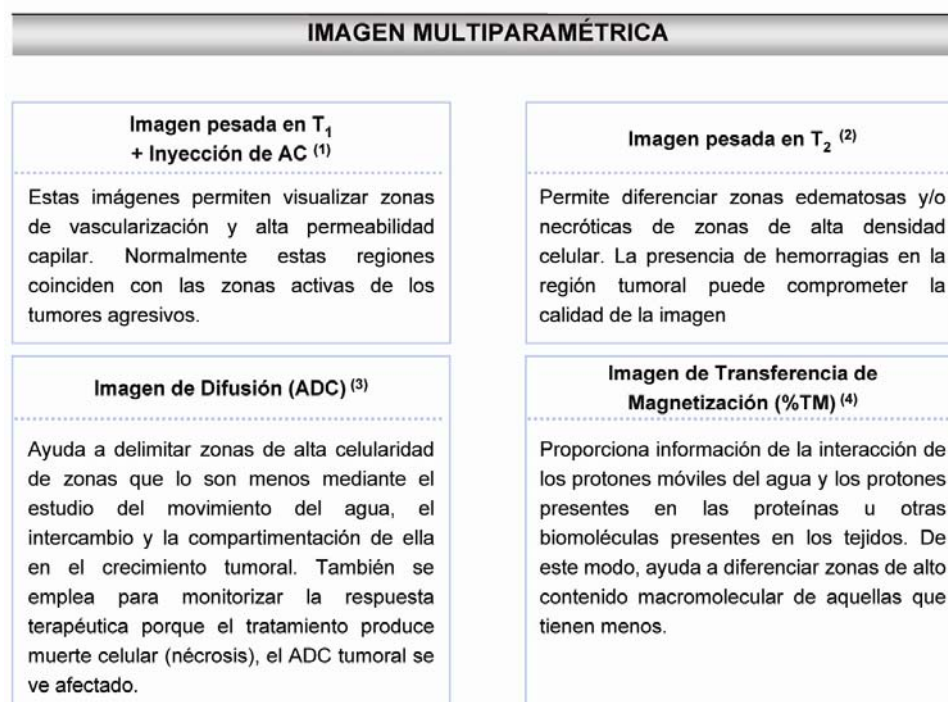


Figura 10. La imagen multiparamétrica investigada en esta tesis comprende el conjunto de secuencias potenciadas en T_1 , T_2 , ADC y %TM.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es investigar *in vitro* e *in vivo*, las bases moleculares de los procesos de Transferencia de Magnetización entre grupos NH intercambiables de polipéptidos y proteínas y el solvente. Más concretamente se propone:

- Caracterizar las bases termodinámicas de los procesos de transferencia de magnetización *in vitro* empleando soluciones modelo de glutation oxidado como portador de grupos NH₂ y NH con protones intercambiables con el agua del solvente.
- Investigar el papel de la difusión translacional del agua en el mecanismo de la transferencia de magnetización *in vitro* e *in vivo*.
- Estudiar el papel de la Transferencia de Magnetización como mecanismo de contraste complementario o alternativo al pesaje en T₁, T₂ y difusión translacional (ADC) en imágenes de Resonancia Magnética.
- Proponer procedimientos cuantitativos de imagen multiparamétrica para discriminar *in vivo* entre tejido sano, edema circundante y tumor en modelos animales de glioblastoma multiforme.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

El glutathion oxidado (N. Catálogo: 27025-41-8, 98% pureza) y el TSP (N. Catálogo: 24493-21-8, 98% D) se obtuvieron de Sigma Aldrich Chem. Co. (St Louis, Mo, Estados Unidos). El agua deuterada (99.9% ^2H) se compró a Apollo Scientific (Jersey, Inglaterra) y el glicerol (98% w/v) a Panreac (Barcelona, España). Las células C6 (CCL-107) fueron obtenidas de la American Type Tissue collection (ATTC, Virginia, Estados Unidos). La anestesia intraperitoneal fue una mezcla compuesta de Ketolar (Parke Davis, Pfizer, Alemania); Atropina (Braun Medical, Barcelona, España) y Valium (Roche Farma, Madrid, España). El analgésico Meloxicam fue suministrado por los laboratorios Boehringer (Ingelheim, Milán, Italia). La anestesia inhalada fue Isoflurane (Baxter S.L, Valencia, España). El agente de contraste utilizado fue Gd-DTPA (Magnevist, Schering Berlin, Alemania).

3.2. Preparación de soluciones de Glutathion oxidado como modelo *in vitro* en los procesos de Transferencia de Magnetización

El glutathion oxidado es un dipéptido formado por dos péptidos idénticos de γ -glutámico, cisteína y glicina unidos por un puente disulfuro a través de los grupos SH- de la cisteína (**Figura 11**).

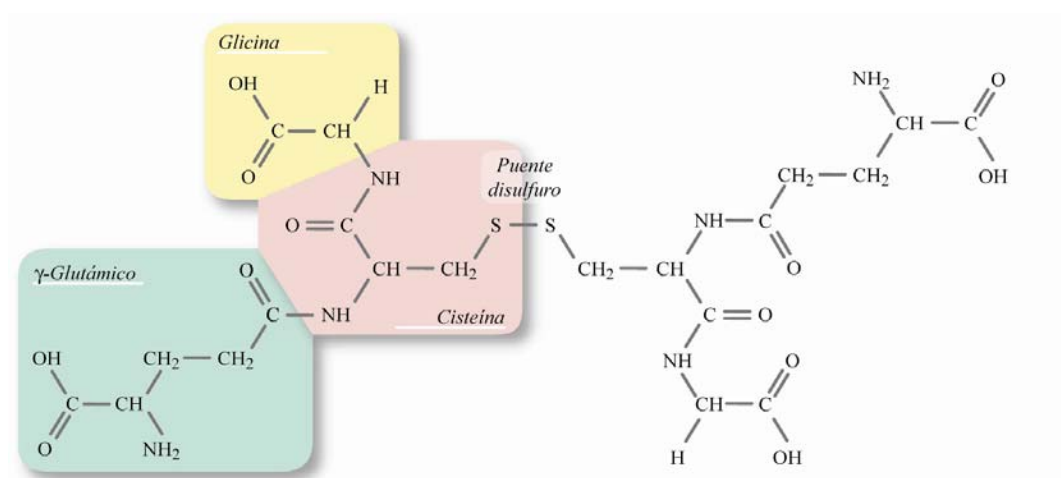


Figura 11. Estructura del glutathion oxidado. La molécula está formada por dos péptidos idénticos de γ -glutámico-cisteína-glicina unidos por un puente disulfuro a través de los grupos SH- de la cisteína.

Este péptido constituye un modelo apropiado para estudiar los procesos de transferencia de magnetización en solución acuosa porque posee un tipo de grupo NH_2 y dos tipos de grupos NH , diferentes magnéticamente y susceptibles de intercambiar su magnetización entre sí o con los protones de las moléculas de agua circundante. Las disoluciones de glutatión oxidado se prepararon disolviendo a temperatura ambiente, la cantidad apropiada del dipéptido en agua mili-Q en concentraciones de 0.5M y 1M. El ajuste del pH a los valores indicados en cada caso se realizó con disoluciones de NaOH o HCl, respectivamente.

3.3. Resonancia Magnética *in vitro*

3.3.1. Espectroscopía de Alta Resolución. Secuencias

En este trabajo se han utilizado dos espectrómetros de Resonancia Magnética de alta resolución: (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania): Bruker AM 8.4T (360 MHz) y Bruker Avance Wide-Bore 11.7T (500 MHz). La **Tabla III** resume las secuencias empleadas en ambos espectrómetros especificando su utilidad particular. Concretamente se han empleado las siguientes secuencias:

- *Secuencia básica de pulso/adquisición (^1H -1D)* ($\text{D1}-\pi/2\text{-ADQ}$) para ajustar la homogeneidad del campo (shimming), centrar y cerrar el campo (Lock) y adquirir espectros de ^1H sin saturación

- *Secuencia Inversión-Recuperación (IR)* ($\text{D1}-\pi-\tau-\pi/2\text{-ADQ}$), empleada para la determinación del tiempo de relajación longitudinal T_1 . Normalmente, se adquirieron 16 espectros con un intervalo (τ) entre 0.1 y 10 veces el valor estimado de T_1 (0.1s hasta 30 s para H_2O) con tiempos de repetición (D1) de $5 \cdot T_1$ (10-15 s, según el T_1 de la muestra) (Kingsley, 1999)

- *Secuencia de Transferencia de Magnetización (TM)* ($\text{D1-D3}-\pi/2\text{-ADQ}$). Antes del pulso de 90° o de adquisición se aplicó un pulso de presaturación de 5s de duración centrado a diferentes frecuencias predefinidas en el rango ($-6000 < \nu < 6000$ Hz), se adquirieron un total de 150-250 espectros (Braun *et al.*, 1998)

Tabla III
Secuencias empleadas en los experimentos de alta resolución ^1H RMN

Secuencia	Diagrama de pulsos	Experimento (secciones)
^1H -1D		Asignación de las señales de Glutation (sección 4.1.1) y determinación del pK_a (sección 4.1.2.)
IR		Determinación del T_1 del agua para el estudio de la influencia de la difusión en la TM (sección 4.1.4.1.)
TM		Estudio de la termodinámica y energética de la TM (sección 4.1.3). Estudio de la influencia del microentorno y la difusión en la TM (secciones 4.1.4.1)
COSY		Correlación de desplazamiento homonuclear 2D (sección 4.1.1)
DOSY		Estudio de la influencia del microentorno. Determinación de la E_a de la difusión en función del pH y la T. (secciones 4.1.4.1 y 4.1.4.2)

D1: tiempo de espera entre dos ciclos ($5 \cdot T_1$), $\pi/2$: pulso de 90° , π : pulso de 180° , τ : tiempo de recuperación de la magnetización, vd: lista variable de intervalos, D3: tiempo de presaturación, D0: incremento de tiempo δ : duración del gradiente, Δ : tiempo de difusión, G_z (G_1 , G_2 , G_3 y G_6): gradientes en dirección z, G_7 : gradiente “spoiler”.

- *Secuencia COSY* ($\text{D1}-\pi/2-\text{D0}-\pi/2-\delta--\pi/2-\delta--\pi/2-\delta-\text{ADQ}$). Este experimento permite obtener información de las conectividades protón-protón a través de un enlace por la constante de acoplamiento homonuclear J_{HH} . El empleo de los gradientes en esta secuencia tiene el mismo significado que en el experimento PFG, el tiempo de mezcla

está entre dos pulsos de excitación, además, hace que disminuya el tiempo de adquisición del experimento (Hurd, 1990; Davis *et al.*, 1991; Carpenter *et al.*, 1992)

- *Secuencia DOSY-2D (Diffusion Ordered Spectroscopy)* ($D1-\pi/2-\delta-\pi/2-\Delta-\pi/2-\delta-ADQ$). Esta secuencia se empleó para la determinación del Coeficiente de Difusión Translacional (ADC) en las soluciones modelo. Se basa en la secuencia PFGSE (Pulse Field Gradient Spin Echo). Básicamente, se adquieren una serie de espectros monodimensionales manteniendo en cada uno, todos los parámetros idénticos excepto la potencia del gradiente G que aumenta progresivamente en pequeños incrementos. Se recoge un eco estimulado con los gradientes de difusión en dirección z (G_6 y G_7) dejando un tiempo de difusión (Δ) entre los pulsos de excitación. El coeficiente de difusión aparente del agua (ADC) se calcula mediante un ajuste monoexponencial de la intensidad obtenida frente a la fuerza de gradiente usando la ecuación de Stejskal-Tanner (Cabrita *et al.*, 2002):

$$I = I_0 \exp(-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) ADC) \quad [8]$$

donde I_0 es la intensidad inicial, γ la constante giromagnética para 1H ($26751 \text{ rad} \cdot G^{-1} \cdot s^{-1}$), G es la potencia del gradiente (G/cm), δ es la duración del gradiente ($0.001-0.003 \text{ s}$) y Δ es la duración del eco estimulado (aproximadamente $0.2s$). El ADC así obtenido se expresan en unidades de velocidad mm^2/s

En los estudios de espectroscopía de alta resolución, se empleó un capilar externo de TSP de concentración 100 mM en agua deuterada, que sirvió como referencia externa del desplazamiento químico y como señal para el bloqueo del campo (lock). La anchura de barrido fue de 20 ppm en todos los casos.

3.3.2. Determinación de las magnitudes termodinámicas del proceso de Transferencia de Magnetización

La termodinámica de la Transferencia de Magnetización se investigó en disoluciones de glutatión $1M$ en tres condiciones de pH diferentes (4 , 6.5 y 9) y en un rango de temperaturas $295 < T \text{ (K)} < 330$. Las variables termodinámicas de entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) para los procesos de transferencia de magnetización se determinaron en los espectros z mediante el análisis de Van't Hoff [ver Ec. 11 y 12].

Los valores de ΔH y ΔS permitieron determinar la espontaneidad del proceso de la TM ($\Delta G \leq 0$) en el rango de temperaturas estudiado según la expresión [9]:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad [9]$$

La **Figura 12** muestra un ejemplo representativo de un espectro de transferencia de magnetización (TM) conocido como espectro z (Bryant, 1996; Ward *et al.*, 2000). Los espectros z representan la relación de intensidades relativas (M_s/M_o) de la resonancia del agua (ν_{H_2O}) cuando se aplican pulsos de presaturación a diversas frecuencias en el rango ($\nu_1 < \nu_{H_2O} < \nu_2$). M_o y M_s representan la intensidad de la resonancia del agua en el equilibrio en ausencia y presencia de presaturación, respectivamente. En el espectro z, esta relación de intensidades se representa en función de la frecuencia (offset) de aplicación de la presaturación. Estos espectros muestran normalmente una apariencia de lorentziana invertida. Los mínimos reflejan las frecuencias de TM máxima y la línea base (parte superior del espectro z, $y_{01} \approx 1$) el intervalo de frecuencias con ausencia de intercambios. La anchura de la resonancia z refleja la dispersión de la transferencia de magnetización alrededor del máximo. El espectro z de la **Figura 12** corresponde a una solución de glutation oxidado pH 4.0 a 295 K y contiene la superposición de dos picos. Uno centrado a 4.7 ppm, contiene los intercambios de magnetización entre moléculas de agua (H_2O-H_2O), mientras que el otro centrado a 8.0 ppm contiene los intercambios de magnetización entre los grupos NH del glutation y las moléculas de agua ($NH-H_2O$). Es posible desconvolucionar este espectro en sus dos componentes individuales, y calcular las características de cada una, ajustando los datos a la suma de dos lorentzianas (SPSS v 13.0, Inc, Chicago, USA) según la ecuación:

$$y = y_{01} + \frac{a}{1 + \left(\frac{x_1 - x_{01}}{b}\right)^2} + \frac{c}{1 + \left(\frac{x_1 - x_{02}}{d}\right)^2} \quad [10]$$

donde los parámetros x_{01} y x_{02} representan los mínimos de cada pico z, a y c la intensidad de cada pico z y b y d la anchura a media altura de cada pico z, respectivamente.

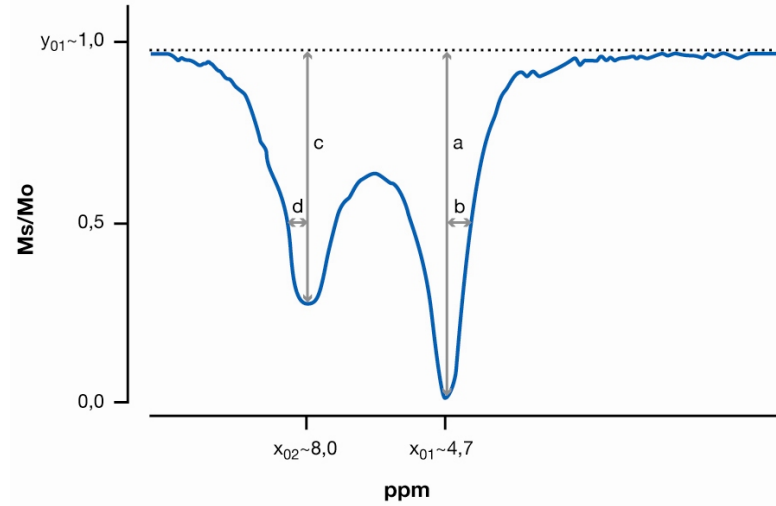


Figura 12. Espectro z de una solución modelo de glutatión 1M (pH 4.5, 295K). Se pueden determinar los parámetros de altura (a y c), media anchura (b y d) y mínimo de frecuencia (x_{o1} , x_{o2}) de cada una de las componentes mediante un ajuste no lineal a la ecuación de la suma de lorentzianas.

Con los valores de b y d obtenidos de los espectros z a diversas temperaturas, se pueden calcular las magnitudes termodinámicas ΔH y ΔS mediante la ecuación de Van't Hoff tanto para el intercambio H_2O-H_2O (b) como para el $NH-H_2O$ (d):

$$\ln(b) = -\frac{\Delta H_{H_2O-H_2O}}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_{H_2O-H_2O}}{R} \quad [11]$$

$$\ln(d) = -\frac{\Delta H_{R-NH-H_2O}}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_{R-NH-H_2O}}{R} \quad [12]$$

donde R es la constante de los gases (8.31 J/mol.K) y T la temperatura absoluta.

3.3.3. Relación entre difusión translacional y transferencia de magnetización

En un primer estudio, se investigó la relación entre el coeficiente aparente de difusión translacional (ADC), el porcentaje de transferencia de magnetización y la variación en los tiempos de relajación T_1 del agua a pH 7.0 y 310K. Este estudio se realizó en dos experimentos independientes. En el primero se mantuvo constante la concentración de glutatión a 1M y se varió el porcentaje de glicerol entre 15%, 33% y 50% v/v. En el segundo, lo que se mantuvo constante fue la relación glutatión/agua entre 1M y 0.5M, variando las concentraciones de glicerol en el mismo rango. Este

diseño permite aislar los efectos de microviscosidad y el ADC sobre la transferencia de magnetización, de los causados por los cambios inevitables en la concentración de agua al aumentar la concentración del agente viscosizante.

Posteriormente, se investigó la influencia de la difusión en los procesos de TM sobre soluciones de glutathione en presencia de concentraciones crecientes de glicerol hasta el 50% (v/v) como agente viscosizante. En particular, se investigó la energía de activación (E_a) de la difusión de las moléculas de agua a tres pH's (4, 7 y 9) y tres temperaturas (298, 310 y 330 K), respectivamente. Se determinó la E_a de la difusión translacional (ADC) de las moléculas de agua, en las condiciones anteriormente citadas, mediante la ecuación de Arrhenius: (Fernandez-Seara *et al.*, 2002).

$$ADC = ADC_0 \cdot e^{-E_a/RT} \quad [13]$$

3.3.4. Imagen multiparamétrica *in vitro*. Adquisición de Imágenes por Resonancia Magnética, ponderación en T_1 , T_2 , TM y difusión

Los experimentos de imagen por Resonancia Magnética se llevaron a cabo empleando las soluciones modelo de glutathione oxidado indicadas (250 μ L) contenidas en maniqués mutipocillo. Se utilizó un espectrómetro Bruker Pharmascan de 7T (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania) equipado con gradientes de 200 mT/m activamente apantallados. Los estudios con glutathione oxidado se completaron con la adquisición de imágenes ponderadas en T_1 , T_2 , difusión y Transferencia de Magnetización. La obtención de mapas paramétricos permitió correlacionar estos resultados con los obtenidos por espectroscopía de alta resolución, en las mismas soluciones.

La adquisición de imágenes potenciadas en T_1 , T_2 , difusión y transferencia de magnetización se realizó empleando secuencias convencionales de imagen RM (Nitz and Reimer, 1999):

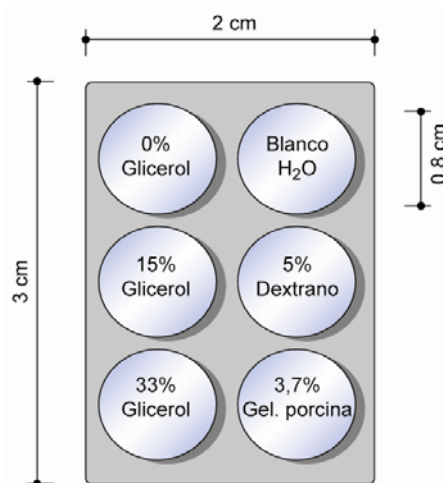
- *Imágenes ponderadas en T_1* . Los mapas de T_1 se obtuvieron por saturación progresiva y empleando una secuencia de eco de espín con un TE constante de 9.2 ms y varios TRs entre 40 -2400 ms.
- *Imágenes ponderadas en T_2* . Los mapas de T_2 se calcularon empleando una secuencia de eco de espín multieco. El TR aplicado fue 5000 ms y el primer TE de 10 y el último de 450 ms. Se adquirieron un total de 45 imágenes, una por cada eco.

- *Imágenes ponderadas en difusión.* Se empleó la secuencia de Stejskal-Tanner. Esta secuencia es una modificación de la de eco de espín que incluye gradientes de difusión entre los pulsos de $\pi/2$ y π . El tiempo de eco empleado para las medidas fue de 17.256 ms. y los valores de b: 50, 150 y 440 s/mm².

- *Imágenes de Transferencia de Magnetización.* La secuencia empleada fue de eco de espín, incorporando un módulo previo de presaturación compuesto por un tren de 50 ó 100 pulsos gaussianos (10 ms.) separados por un intervalo de 0.3 μ s y 5.5 μ T de potencia. Los parámetros TR= 2500 ms y TE= 9.76 ms. permanecieron constantes tanto para las imágenes M_0 como para las imágenes M_s . Para obtener el mapa de Transferencia de magnetización, se adquirió una imagen sin saturación (M_0) y otra imagen con transferencia de magnetización (M_s). El porcentaje de transferencia de magnetización (%TM) viene definido como $100 \times (1 - M_s/M_0)$ (Dousset *et al.*, 1992).

El maniquí utilizado fue una placa multipocillo adaptada con 6 pocillos (**Figura 13**). Uno de ellos contenía agua mili-Q como blanco, mientras que el resto contenía disoluciones de glutatión 1M en presencia de diferentes agentes viscosizantes como glicerol, dextrano y gelatina.

Figura 13. Diseño y contenido del maniquí diseñado para investigar los efectos de la difusión translacional sobre la transferencia de magnetización en experimentos de imagen en Resonancia Magnética



Se realizaron dos estudios independientes. En el primero, se obtuvo el mapa de TM aplicando la presaturación a la frecuencia sobre los grupos NH del glutatión (a 990 Hz. del agua) empleando un tren de 50 pulsos de presaturación, como se ha indicado más arriba. En el segundo estudio se investigaron las variaciones en el mapa de TM al incrementar a 100 el número de pulsos de presaturación, barriendo en ambos casos el mismo intervalo de frecuencias necesario para obtener los espectros z correspondientes ($-6000 \text{ Hz} < \nu < 6000 \text{ Hz}$).

3.4. Estudio computacional: obtención de mapas de interacción molecular del sistema agua-glutation oxidado

Se realizaron estudios computacionales con objeto de determinar la distribución espacial óptima de las moléculas de agua alrededor del glutatión y caracterizar las energías envueltas en esta interacción. En principio, se puede suponer que la molécula de glutatión en disolución acuosa puede presentar tres estados de ionización diferentes: (A) forma neutra no-zwiteriónica; (B) forma neutra zwiteriónica, favorecida por el medio polar; y (C) forma desprotonada zwiteriónica, puesto que el grupo C-terminal del resto glicina presenta un pK_a bajo ~ 3.0 (Kyte, 1995). La **Figura 14** muestra las tres estructuras:

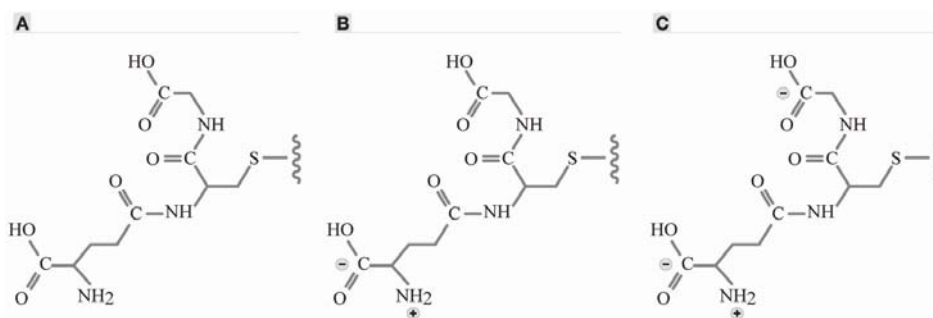


Figura 14. Estados de ionización analizados

Para ello, se emplearon diversas técnicas computacionales:

1.- Inicialmente, se realizó un análisis conformacional de la estructura del glutatión oxidado con el fin de seleccionar el conformero más estable. Para ello, se aplicó un algoritmo de búsqueda aleatorio y como método de optimización se empleó el campo de fuerza MMFF94 (Halgren, 1996). Este estudio se llevó a cabo con el programa PC Spartan Pro PC (v1.0.5, Wavefunction Inc, Irvine, CA) y resultó especialmente útil para la estructura A. Sin embargo, para las formas zwiteriónicas B y C hubo que adoptar otra aproximación. En general, las estructuras que implican separación de cargas presentan más complicaciones a la hora de ser modelizadas, especialmente en disolución. Por ello, en lugar de realizar análisis conformacionales para B y C, se construyeron y optimizaron (mediante la técnica descrita en el punto 2) diferentes conformaciones para cada estado con el fin de estimar las conformaciones favorecidas en disolución acuosa.

2.- Mediante el programa Gaussian03 (revisión B.03; Gaussian, Inc. Pittsburgh, PA) se realizó una optimización de geometría en disolución acuosa del confórmero más estable obtenido, al nivel RHF/6-31G(d) empleando el modelo de solvatación continuo CPCM (Barone and Cossi, 1998; Cossi *et al.*, 2003) para simular los efectos del disolvente (constante dieléctrica $\epsilon=78.4$).

3.- Sobre la estructura optimizada, se llevó a cabo el cálculo de la energía de interacción con el programa GRID (Molecular Discovery Ltd., Londres, UK). Para estimar las zonas mas favorables de interacción con agua se empleó “OH2” como sonda. Para calcular la energía de interacción glutation-sonda, se consideró la influencia de tres términos: interacción por formación de enlaces de hidrógeno, potencial electrostático y potencial de Lennard-Jones por efectos de inducción y dispersión. La resolución utilizada fue de 0.2 Å. Para tener en cuenta la flexibilidad del glutation, se empleó la directiva MOVE. Con el fin de obtener una visión tridimensional de la energía de interacción obtenida en cada punto, se han representado los mapas MIF (Molecular Interaction Field) a diferentes valores de energía, es decir, como contornos de isoenergía que unen los puntos en los que la energía de interacción con la sonda es la misma (Cruciani, 2005).

Los mapas MIF representados en el texto corresponden a intervalos de 0.5 kcal mol⁻¹, desde el valor de energía más negativo para mostrar la secuencia de posiciones mas favorables en función de la energía.

4.- Como cuestion adicional, se llevaron a cabo cálculos para determinar la estabilidad relativa de la forma neutra zwiteriónica B respecto de A, con el fin de estimar el grado de presencia de ambas formas en disolución. Para ello, se computó la energía libre en condiciones normales (298 K, 1 atm.) de estas estructuras optimizadas al nivel B3LYP/6-31G*/CPCM (Lee *et al.*, 1988; Becke, 1993)

3.5. Animales y Diseño Experimental

3.5.1. Cultivos de células C6

Las células C6 empleadas en esta Tesis se obtuvieron de la American Type Tissue collection, procediendo originalmente de la línea celular de glioma C6 establecida por Benda a partir de un glioma de rata inducido por metil-nitrosourea (Benda *et al.*, 1968; Benda *et al.*, 1971). Las células se crecieron en monocapa sobre

placas Petri de 10 cm de diámetro hasta confluencia, empleando Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Portais *et al.*, 1993; Bouzier *et al.*, 1998), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), gentamicina (25 µg/ml) e incubado en una estufa de cultivo a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad (Thermo forma series II water jacketed CO₂ incubator, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, U.S.A.).

3.5.2. *Implantación estereotáxica de células C6 en cerebro de rata*

Una vez alcanzado el 80-90% de la confluencia, las placas de cultivo se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS- KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM), se levantaron con tripsina (0.25% en PBS), se recolectaron en tubos Falcon con un pequeño volumen de DEMEM y finalmente, se contó el número de células totales. Se repartió la suspensión celular en tubos Eppendorff (10⁶ células/tubo), se centrifugaron durante 5 minutos a 400g y se eliminaron los sobrenadantes. Los pellets obtenidos se conservaron en hielo hasta su implantación, asegurándose de que este período no fuera superior a una hora. Antes de utilizar las células, éstas se atemperaron a 37°C y se resuspendieron en 100 µL de DMEM suplementado (10% v/v SFB, 1% v/v penicilina- streptomicina y 2% v/v L-glutamina). De la suspensión celular, se tomaron 10 µl con una jeringa Hamilton para proceder a la implantación de un total de 10⁵ células por animal.

Para la implantación esterotáxica se emplearon ratas Wistar hembras de 200-250 gramos que recibieron alimento y agua *ad libitum*. Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketolar:Atropina:Valium (10:1:8) proporcionando una dosis de 0.1 mL mezcla/100g peso de rata. La implantación de las células C6 (**Figura 15.A**) se realizó en el núcleo caudado en un cuadro estereotáxico (David Kopf Instruments, California, USA) (**Figura 15.B**), siguiendo el método descrito por Benabid (Benabid *et al.*, 1986), derivado del original propuesto por Kobayashi (Kobayashi *et al.*, 1980). Durante todo el procedimiento, se inmovilizó al animal mediante dos barras insertadas en los conductos auditivos (**Figura 15.C**) y una barra dental (**Figura 15.D**), consiguiéndose así una fijación óptima.

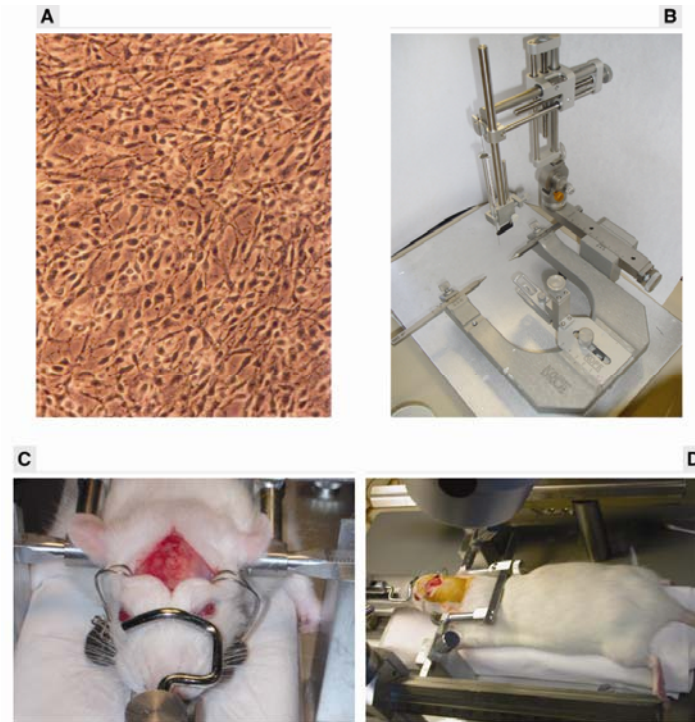


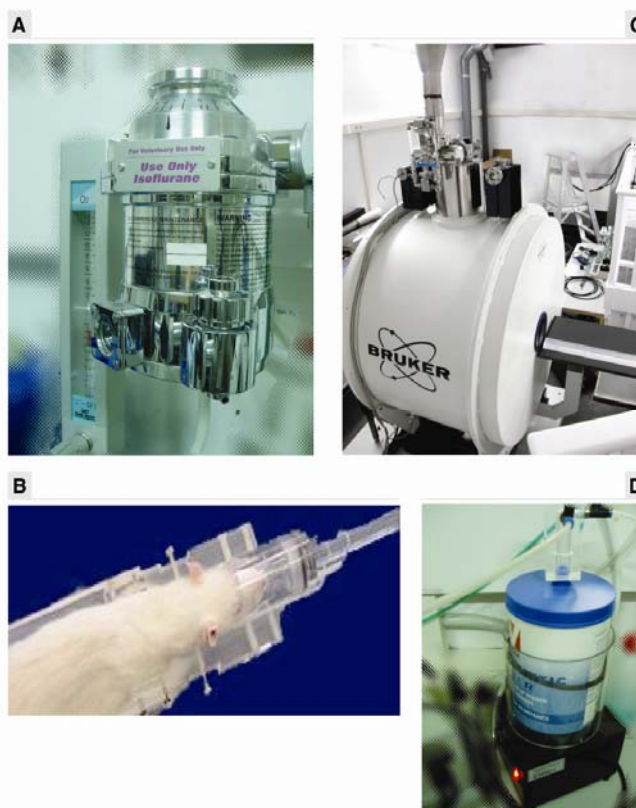
Figura 15. Implantación estereotáxica de células C6 en cerebro de rata. A. Cultivo de células C6 crecidas hasta confluencia. **B.** Cuadro estereotáxico para la implantación de las células en el núcleo caudado del cerebro de rata. **C y D.** Fijación del animal en el aparato estereotáxico y preparación para la implantación de las células.

La piel del cráneo se desinfectó con una solución de Betadine al 10% y se practicó una incisión longitudinal con un bisturí. Sobre el cráneo se echaron unas gotas de una solución de lidocaína al 2% con adrenalina (Xylocaine® 2% Adrenalina; Astra). La lidocaína actúa como anestésico local y la adrenalina produce una acción vasoconstrictora que evita hemorragias, aumentando también el papel anestésico de la lidocaína. Se determinaron las coordenadas del punto de inyección, a nivel del núcleo caudado derecho, mediante un atlas estereotáxico de rata (Paxinos and Watson, 1997). Como referencia anteroposterior se tomó la sutura de Bregma, a partir de la cual se midieron 3.5 mm a la derecha. En ese punto se realizó una craneotomía empleando una micro-broca de 1 mm de diámetro (Axis, Irving, Texas). Las células se depositaron a 5 mm de profundidad desde el cráneo. Una vez realizada la implantación, se selló la craneotomía con cemento dental y se cosió la piel con hilo de sutura. Para evitar infecciones en la sutura y el dolor posquirúrgico, se aplicó una solución de Betadine al 10% y una inyección subcutánea de analgésico Meloxicam 5mg/ml. Esta inyección se repitió cada 12 horas durante los 3 días siguientes a la implantación.

3.5.3. Preparación de animales para imagen RM

El periodo de crecimiento del tumor C6 fue entre 15-20 días. Durante este tiempo, se tomaron imágenes de RM cada 4 ó 5 días para monitorizar el crecimiento del mismo. El animal se introdujo en la caja de inducción de anestesia con una atmósfera saturada de Isoflurano (Aerrane, Baxter S.L. Géminis, Valencia, España) en O₂ (**Figura 16.A**). Después de la inducción, la rata se mantuvo anestesiada con 1,5% v/v de Isoflurano en O₂ a 1mL/min y se canuló la vena de la cola con un catéter (Abocad 24GA Becton Dickinson, Madrid, España) para la inyección del agente de contraste paramagnético Gd-DTPA (Magnevist, Schering, Berlin, Alemania). Seguidamente la rata se colocó en la cama de metacrilato estereotóxica adaptada para RM, y se fijó a la misma mediante una barra dental (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania) (**Figura 16.B**). A continuación se introdujo todo el montaje en el equipo de RM (**Figura 16.C**). El exceso de anestesia se eliminó a través de un sistema de aspiración de gases con un filtro recolector (Kruuse, Marslev, Dinamarca) (**Figura 16.D**).

Figura 16. Dispositivo de anestesia con gases fluorados y colocación del animal en el equipo de imagen de RM. Mezclador de Isoflurano/O₂ (A). La mezcla fluye a través de los conductos que conectan el mezclador con la cama estereotóxica (B) donde permanece el roedor durante el periodo experimental. Una vez fijada la rata a la cama estereotóxica, ya está preparada para ser introducida en el espectrómetro de 7T (C). El exceso de anestesia es recogido por un filtro de carbón activo mediante un circuito de recogida (D)



Para mantener la temperatura corporal de la rata durante el experimento, se colocó por debajo del cuerpo del animal una cama de recirculación de agua a 37°C (TPump, Gaymar, Nueva York, USA). La temperatura se monitorizó continuamente durante el experimento utilizando una sonda rectal (Cibertec, CITER, Madrid, España) y la respiración mediante un balón contraible (Sims Graseby, Watford, Inglaterra) colocado bajo el animal y conectado a un sistema transductor de presión computerizado (Bruker Biospin, Ettlinghen, Alemania).

3.5.4. *Análisis histológico de cerebro de rata*

Una vez que terminaron los experimentos de imagen, las ratas se sacrificaron por inhalación con CO₂ y se les extrajeron los cerebros. Estos fueron mantenidos en una disolución de formaldehído al 4% en PB 0,1M y durante toda una noche a 4°C. Al día siguiente, los cerebros se pasaron a una disolución de sacarosa al 30% con 4% de paraformaldehído PB 0,1M hasta que se hundiesen, de esta manera se aseguraba que el cerebro estaba crioprotegido. Los cerebros fueron mantenidos a -70°C hasta que se llevaron al servicio responsable de Patología Molecular donde fueron cortados y teñidos con Hematoxilina-Eosina. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe las estructuras basofílicas (ribosomas, creatina, etc.) de azul, mientras que la eosina, que es un colorante ácido, tiñe las estructuras llamadas eosinófilas (generalmente compuestas de proteínas) de color rosa. Por tanto en esta tinción los núcleos aparecen de un color azul intenso y el citoplasma de color rosa. La hematoxilina también tiñe la mielina débilmente pero el efecto es inapreciable al combinarse con la eosina (Baratti *et al.*, 1999; Bancroft and Gamble, 2002).

3.6. **Resonancia Magnética *in vivo***

3.6.1. *Adquisición de Imágenes RM, ponderación en T₁, T₂ y difusión*

La adquisición de imágenes potenciadas en T₁, T₂, difusión y transferencia de magnetización para obtener lo correspondientes mapas paramétricos se hizo sobre ratas portadoras de gliomas C6. La instrumentación RM (Bruker Pharmascan 7T) y secuencias empleadas para estos estudios fueron las mismas que las empleadas para los experimentos del maniquí de glutathione (sección 3.3.4.) aunque los parámetros de adquisición se modificaron para adaptarlos a las condiciones *in vivo*.

En este apartado se explicará la adquisición de imágenes potenciadas en T_1 , T_2 y difusión. La secuencia de transferencia de magnetización se describe en el apartado siguiente, donde se indica como se llevó a cabo la optimización de esta secuencia:

- *Imágenes ponderadas en T_1 .* Los mapas de T_1 se obtuvieron por saturación progresiva empleando una secuencia de eco de espín con un TE constante de 9.2 ms, variando los TR entre 60 y 6000 ms. También se empleó esta secuencia para estudiar la vascularización del tumor inyectando Gd-DTPA (0.1mmol/Kg.peso) en la vena de la cola del animal. Se adquirió una colección de imágenes (50-70) para obtener la cinética del agente de contraste a su paso por la zona tumoral. En este caso, se adquirieron imágenes con un TR de 200 ms y un TE de 9.2 ms

- *Imágenes ponderadas en T_2 .* Los mapas de T_2 se obtuvieron empleando una secuencia de eco de espín multiecho. El TR empleado fue de 5000 ms y un número total de ecos de 45 con un tiempo entre ellos de 10 ms, lo que permitió adquirir imágenes con tiempos de eco efectivos entre 10 y 450 ms.

- *Imágenes ponderadas en difusión.* Se empleó la secuencia de Stejskal-Tanner. Esta secuencia es una modificación de la de eco de espín que incluye gradientes de difusión. Los parámetros TR (2500 ms) y TE (25 ms) permanecieron constantes. El tiempo del gradiente de difusión (δ) fue de 4 ms. y el tiempo de difusión (Δ) de 16 ms. El coeficiente de difusión se calculó utilizando tres valores de b: 100, 400 y 1000 s/mm^2 .

3.6.2. Optimización de la secuencia con Transferencia de Magnetización. Adquisición de Imágenes con Transferencia de Magnetización

Como modelo para la optimización de la secuencia, se empleó un animal con crecimiento tumoral. De esta manera, se estudiaron las diferencias en el contraste entre el tejido sano contralateral, zona tumoral y ventrículo izquierdo. En esta última región solo hay líquido cefalorraquídeo. Por tanto no habrá transferencia de magnetización a menos que se produzca una saturación directa del agua o una extravasación de macromoléculas desde la zona tumoral a la zona ventricular. Para la optimización de los parámetros del módulo de TM se tuvo en cuenta la tasa específica de absorción (SAR: specific absorption rate) (Wang *et al.*, 1997; Gochberg *et al.*, 1999) cuyo valor proporciona una medida de la absorción de energía por unidad de masa medida en (W/kg). La tasa de absorción específica aumenta con la fuerza del campo, con la

potencia del pulso de radiofrecuencia y con el tiempo en que los gradientes permanecen activos a máxima potencia. También hay que tener en cuenta el tipo de la bobina transmisora y el tamaño de la muestra. A campos altos, y con algunas de las secuencias que utilizan múltiples ecos, se incrementa significativamente el riesgo de generar valores demasiado altos de SAR (Wang *et al.*, 1997). La optimización de la secuencia de TM se basó en los valores descritos de la literatura (Lemaire *et al.*, 2000; Vonarbourg *et al.*, 2004). Los parámetros estudiados fueron: el número de pulsos aplicados en la saturación (n), la duración de este pulso (ms) y la frecuencia a la cual se aplicó la saturación (Hz.). La potencia de saturación se varió entre 5.5 μ T y 12 μ T. En estos experimentos se adquirió una imagen de eco de espín sin saturación (TR: 2500 ms, TE: 9.76 ms) que corresponde a la imagen M_0 ; e imágenes con el módulo de TM activado (M_s) manteniendo los mismos parámetros de TR y TE, y variando el número de pulsos de saturación (50, 100 y 200), su longitud (2.5, 5 y 10 ms), la frecuencia de aplicación de los mismos (1500 Hz y -1500 Hz) y su potencia (entre 5.5 y 12 μ T). La duración y el tipo de pulso (Gaussiano, en este caso) determinan el ancho de banda de excitación TM, que se optimizó para evitar la saturación directa de la señal de agua libre. La duración del módulo de TM viene determinada por un intervalo entre pulsos constante (0.3 μ s), por el número y duración de los pulsos. La relación entre el número de pulsos y la duración de los mismos ayudó a optimizar la secuencia de acuerdo a los valores mostrados en la **Tabla IV**.

Tabla IV
Optimización de la secuencia TM *in vivo*.
Determinación del ancho de banda del pulso y tiempo del módulo de TM

Duración pulso (ms)	Número de pulsos		
	50	100	200
2.5	1096Hz/225ms*	1096Hz/450ms	1096Hz/900ms
5	548Hz/350ms	548Hz/700ms	548Hz /1400ms
10	274Hz/600ms	274Hz/1200ms	274Hz/2400ms

*Los datos indican el ancho de banda del módulo de TM (Hz)/duración total del módulo (ms.)

3.6.3. Parámetros de adquisición de las imágenes de RM.

La **Figura 17** presenta un esquema de cada una de las secuencias empleadas en los estudios de imagen *in vivo* por Resonancia Magnética.

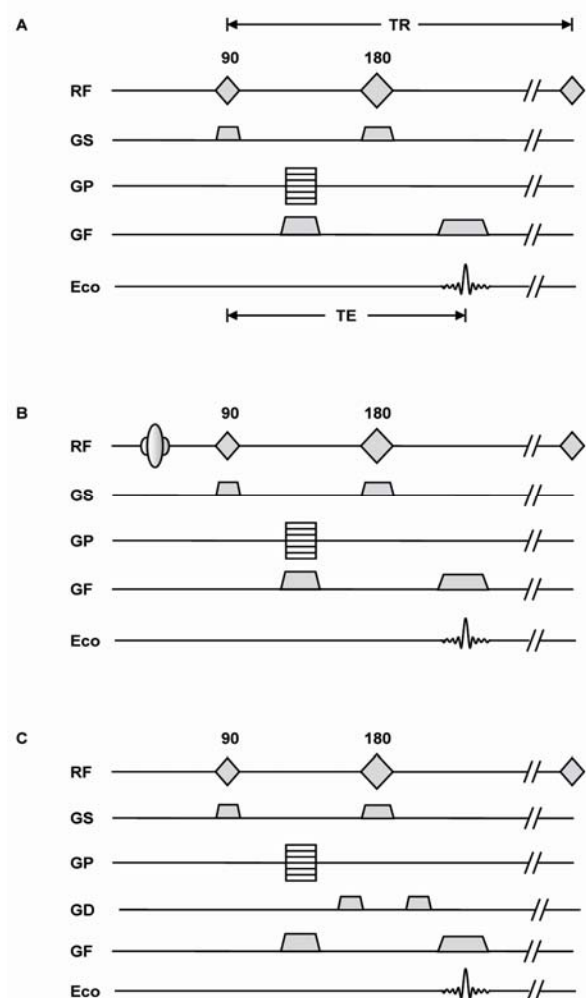
Figura 17. Secuencias de Imagen de RM empleadas en los experimentos *in vivo*.

A: Secuencia espín-eco para adquisición de imágenes potenciadas en T_1 y T_2 .

B: Secuencia espín-eco con el pulso de presaturación de TM

C: Secuencia espín-eco con gradientes de difusión.

GS: Gradiente de Sección
GP: Gradiente de Fase
GF: Gradiente de Adquisición
GDiff: Gradiente de Difusión
RF: pulso de excitación
Eco: señal recibida
TE: Tiempo de Eco
TR: Tiempo de Repetición



La **Figura 18** muestra un ejemplo de los parámetros más importantes que hay que tener en cuenta para la adquisición de las imágenes con distinto pesaje. Como aparece en la figura, la imagen pesada en T_1 se adquiere a TR y TE cortos con la secuencia eco de espín comentada anteriormente, mientras que la imagen pesada en T_2 es adquirida a TR y TE largos. En la imagen pesada en difusión, los tiempos TR y TE permanecen constantes, también los valores de δ y Δ , variando en cada imagen adquirida los valores de b (s/mm^2). Finalmente, en la imagen de Transferencia de

Magnetización las imágenes sin (M_0) y con presaturación (M_s), se adquieren con los mismos parámetros de TR y TE, diferenciándose por la aplicación o no del módulo de TM optimizado como se ha indicado anteriormente.

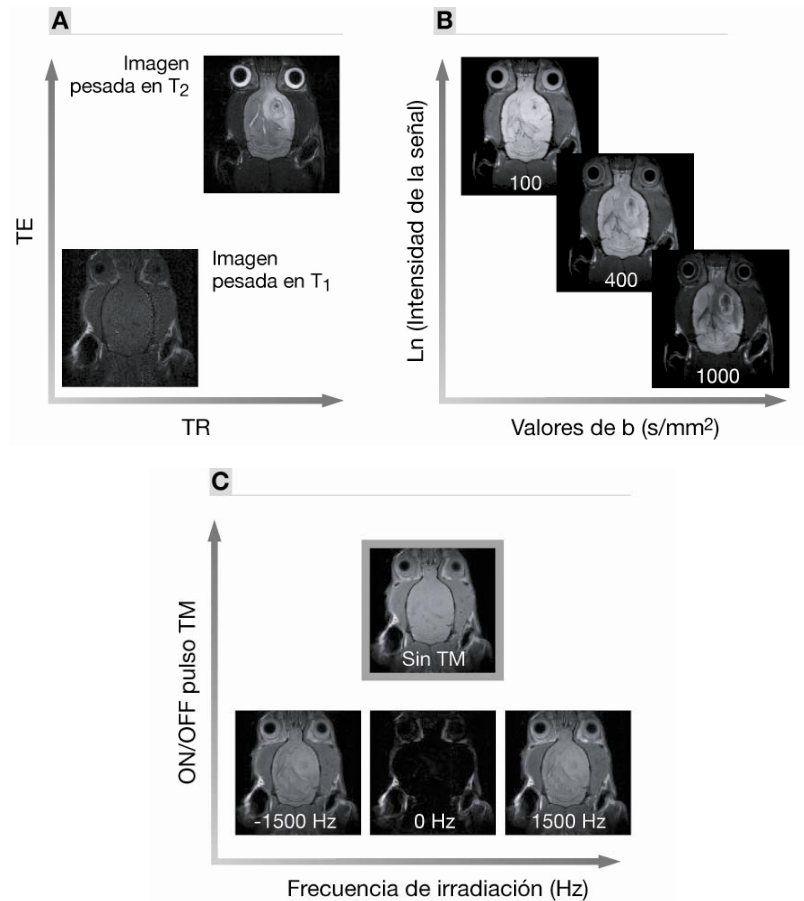


Figura 18. Parámetros a tener en cuenta en la adquisición de la imagen por RM ponderadas con diferentes tipos de contraste. A: imágenes potenciadas en T₁ y en T₂ obtenidas con la misma secuencia eco de espín pero variando los tiempos de repetición (TR) y de eco (TE). B, imágenes potenciadas en difusión a diferentes valores de b. Para generar el contraste por Transferencia de Magnetización (C) se adquiere una imagen sin módulo de presaturación TM (M_0) y otra con activación del módulo TM a una frecuencia de irradiación determinada (M_s).

Las imágenes adquiridas se procesaron para obtener los mapas paramétricos de T₁, T₂, ADC y transferencia de magnetización como se indica en la sección siguiente.

En el estudio de imagen multiparamétrica se emplearon nueve ratas con glioma C6 implantado ortotópicamente, según se explicó en el apartado 3.5.2. Una vez colocado el animal en el interior del imán, se tomó una imagen rápida de eco de gradiente FLASH (TR: 100 ms., TE: 4.3 ms, 512x256 píxeles) con objeto de localizar

el cerebro en las tres direcciones del espacio (axial, sagital y coronal) y situarlo en el centro del resonador. A continuación, se adquirieron imágenes anatómicas potenciadas en T_2 (TR: 4000 ms, TE: 65 ms, tamaño de la matriz 256x256 corte coronal) empleando una secuencia de eco de espín con adquisición multieco, RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement). A partir de estas imágenes tomadas como referencia, se seleccionaron los mejores cortes con el fin de adquirir las imágenes de T_1 , T_2 , difusión y transferencia de magnetización con los parámetros anteriormente citados. Todas las imágenes se adquirieron con el mismo tamaño de matriz (128x128), permitiendo así la correlación espacial entre todas ellas.

3.7. Procesamiento de imágenes y obtención de mapas paramétricos

Las imágenes adquiridas por RM fueron procesadas utilizando programas desarrollados en el laboratorio, empleando el lenguaje de programación IDL (Iterative Data Language, Research Systems, Boulder, CO). El análisis de éstas permitió obtener los respectivos mapas paramétricos de T_1 , de T_2 , de ADC y de porcentaje de transferencia de magnetización (%TM). Las ecuaciones empleadas en el cálculo de cada uno de estos parámetros aparecen recogidas en la **Tabla V**.

Tabla V
Ecuaciones utilizadas en el cálculo de los mapas paramétricos

Ecuación	Mapa calculado
$M_s = M_o (1 - e^{(-TR/T_1)})$	T_1
$M_s = M_o \cdot e^{(-TE/T_2)}$	T_2
$Ln(M_s) = -b \cdot ADC + Ln(M_o)$	ADC
$\%MT = \frac{(M_o - M_s)}{M_o}$	% TM

La **Figura 19.1** se muestra un esquema del procedimiento seguido en la obtención de los mapas paramétricos a partir de las imágenes adquiridas. Cada imagen del experimento fue adquirida variando el parámetro x_i correspondiente (TR para T_1 , TE para T_2 , b para ADC y la frecuencia y módulo de TM activado para las imágenes de transferencia de magnetización)

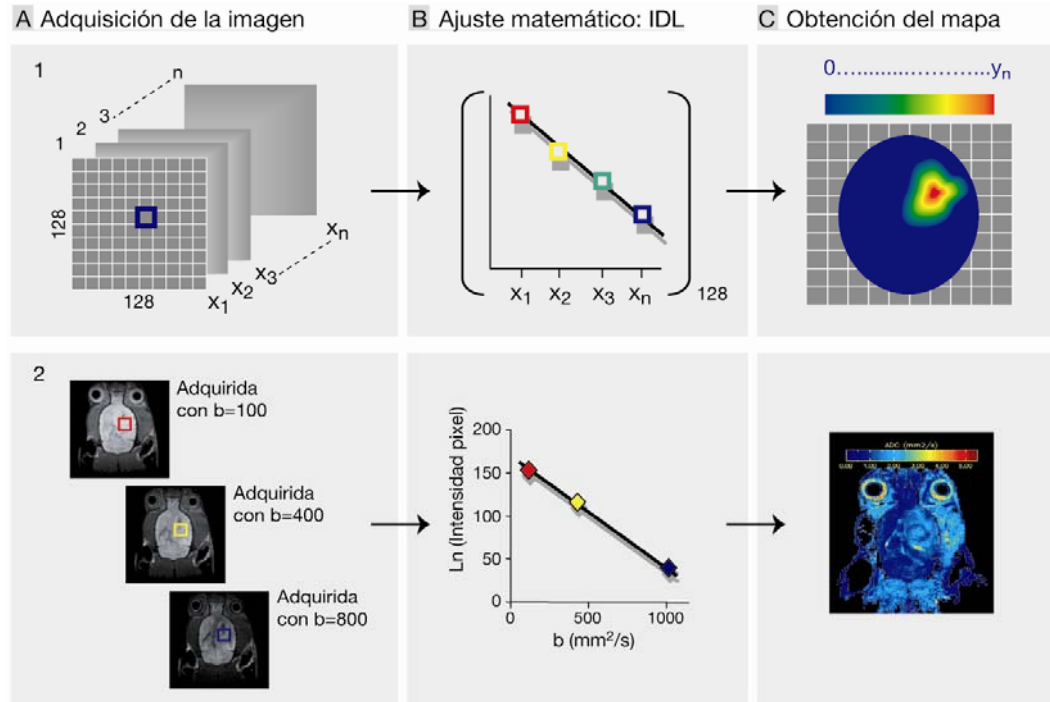


Figura 19. Procedimiento general para la obtención de mapas paramétricos a partir de imágenes RM en experimentos con maniquíes y animales. **A:** En cada imagen se ha variado el parámetro x_i . De la matriz de 128×128 , cada píxel de cada imagen es procesado con IDL. **B:** El valor del píxel es ajustado a la ecuación que corresponda en función de la variable x_i . El ajuste se hace píxel por píxel (128×128). **C:** El procesamiento de la imagen por IDL proporciona un valor numérico. El conjunto de los 128×128 valores representa el mapa. La imagen 2 ilustra la preparación de un mapa de ADC a partir del conjunto de imágenes con diferente valor de b

Básicamente, cada píxel de la matriz de 128×128 de cada imagen, fue procesado matemáticamente con IDL y ajustado a la ecuación correspondiente en función de la variable x_i , (ajuste píxel por píxel: 128×128), proporcionando un valor obtenido en el ajuste matemático. El conjunto de los 128×128 valores ajustados es el que constituye el mapa paramétrico. La **Figura 19.2** proporciona un ejemplo ilustrativo de la obtención de un mapa paramétrico de ADC.

3.8 Análisis estadístico en imágenes paramétricas. Diseño experimental y proceso estadístico

El estudio contó con un total de nueve animales donde cada cerebro fue dividido estadísticamente en tres secciones con un sentido de bloque. A continuación se seleccionaron regiones de interés (ROIs) claramente diferenciadas y sin aproximarse a los bordes. Los ROIs seleccionados fueron necrosis (N), región de alta proliferación celular o zona activa del tumor (T), zona edematosa (E) y tejido sano contralateral (S).

En cada combinación sección x región se midieron alrededor de 50 pixels para tomar datos de los parámetros a estudiar: T_1 , T_2 , ADC y % TM.

En el proceso estadístico, los factores de variabilidad considerados en el estudio fueron animal, sección y región. El factor principal o de máximo interés es la región, pero deben ser considerados animal y sección como factores aleatorios que pueden tener importancia en el resultado final.

Primero, se realizó un estudio descriptivo del comportamiento de los parámetros estudiados relativos a su distribución y comportamiento centrales. Se pudo concluir que la media era una buena aproximación al valor esperado para cada combinación animal x sección x región, con lo cual se trabajó con dos bases de datos: una con la descripción exhaustiva de los datos de cada píxel destinado a procesos de clasificación y otra sobre los valores esperados para los análisis de la varianza. El modelo de análisis de la varianza fue un modelo de medidas repetidas donde cada replicado correspondía a una rata y las repeticiones a su presencia sección x región. Posteriormente se realizó un análisis de pares (Test de Bonferroni) entre cada combinación de regiones. El efecto principal demostrado en este análisis era la región. De esta manera, se planteó un análisis de clasificación sobre la base de datos completa. Por tanto, con los datos recogidos se realizó un análisis de clasificación de las cuatro variables (T_1 , T_2 , ADC y %TM) de cada una de las regiones seleccionadas mediante un método de análisis de inclusión por pasos.

Cada una de las ROIs seleccionadas en los mapas paramétricos se caracterizó por una matriz de datos (x, y, i) donde las variables x e y representan las coordenadas de posición de un píxel determinado y la variable i es la variable numérica de intensidad del píxel dentro del mapa. Las cuatro ROIs se aplicaron automáticamente sobre los cuatro mapas paramétricos (T_1 , T_2 , ADC y %TM). Esta operación se realizó

en todos los animales y en todas las secciones diferentes (n=3) estudiadas para cada animal (n=9).

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS v.13 y con IDL empleando Análisis del Discriminante Lineal (LDA) por pasos sucesivos. Como método de selección se empleó la minimización de Lambda de Wilks, que proporciona un método de discriminación de variables. Este procedimiento escoge variables para su introducción en la función discriminante cuándo contribuyen a disminuir la Lambda de Wilks. Su valor oscila entre 0 y 1, de manera que el poder discriminante es mayor cuanto más próxima a 0. Como método de clasificación se empleó el conocido como Jackknife o LOO (Leave One Out). LOO trabaja con todo el espacio muestral a excepción de una de las observaciones, estimando sobre la nueva muestra de tamaño $N-1$ la clasificación de la unidad en consideración. El proceso se repite una por una, para las N observaciones, con lo que se obtiene una tasa de aciertos del modelo para todos los puntos de la muestra.

Tras el análisis de clasificación y el análisis lineal del discriminante se obtuvieron los correspondientes coeficientes de Fisher. Estos coeficientes se emplearon para calcular mediante IDL los mapas de predicción de pertenencia a las regiones previamente seleccionadas. Se generaron dos tipos de imágenes: los mapas individuales de probabilidad y los mapas combinados tricolor en los que a cada grupo de pertenencia se le asigna un color y el corte (cut-off) estableciendo una probabilidad de 0.9. Las expresiones mostradas a continuación indican la probabilidad de pertenencia de cada píxel en cada región.

$$P_{tumor} = \frac{e^{f_{tumor}}}{\sum e^{f_{tumor} + f_{edema} + f_{tej.sano}}} \quad [14]$$

$$P_{edema} = \frac{e^{f_{edema}}}{\sum e^{f_{tumor} + f_{edema} + f_{tej.sano}}} \quad [15]$$

$$P_{tej.sano} = \frac{e^{f_{tej.sano}}}{\sum e^{f_{tumor} + f_{edema} + f_{tej.sano}}} \quad [16]$$

La **Figura 20** recoge esquemáticamente este procedimiento.

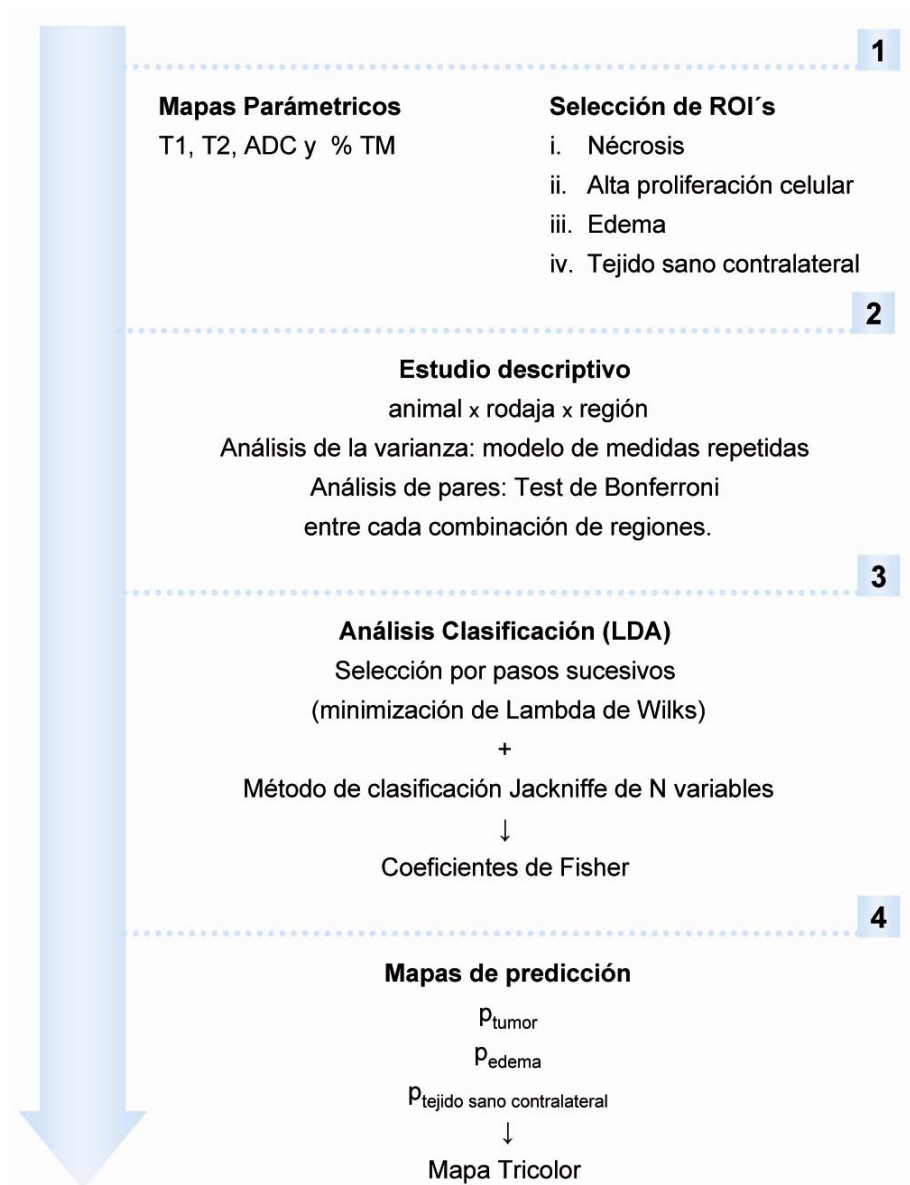


Figura 20. Análisis estadístico. Diseño experimental y proceso estadístico

4. Resultados

4.1. El glutathion oxidado como modelo para la caracterización de procesos de Transferencia de Magnetización *in vitro*

4.1.1. Asignación de las resonancias de ^1H RMN de glutathion

La asignación de las resonancias de ^1H del glutathion en solución acuosa, se llevó a cabo mediante espectroscopía 2D-ge-COSY. Este tipo de espectroscopía 2D permite correlacionar protones acoplados escalarmente (típicamente para valores entre $J_{\text{H-H}}$ 3-15 Hz). La **Figura 21** proporciona un ejemplo ilustrativo mostrando un espectro 2D-ge-COSY de una disolución de glutathion oxidado 1M, pH 4.5 y $T = 295\text{K}$ (**A**), diversas regiones de interés del espectro de alta resolución 1D ^1H RMN (**B**) y la asignación final de las resonancias sobre la estructura del dipéptido (**C**). En particular, los espectros permitieron asignar las señales centradas a 7.62 ppm, 8.25 ppm y 8.45 ppm a los protones pertenecientes a los grupos NH_2 del glutámico, NH de la glicina y NH de la cisteína, respectivamente. Los protones de estos tres grupos son los responsables del intercambio de magnetización con las moléculas de agua circundante. A pH's y temperaturas más elevadas se observó que la señal centrada a 7.62 ppm desaparecía en el espectro, debido al ensanchamiento derivado del rápido intercambio del grupo NH_2 con las moléculas de agua que le rodean.

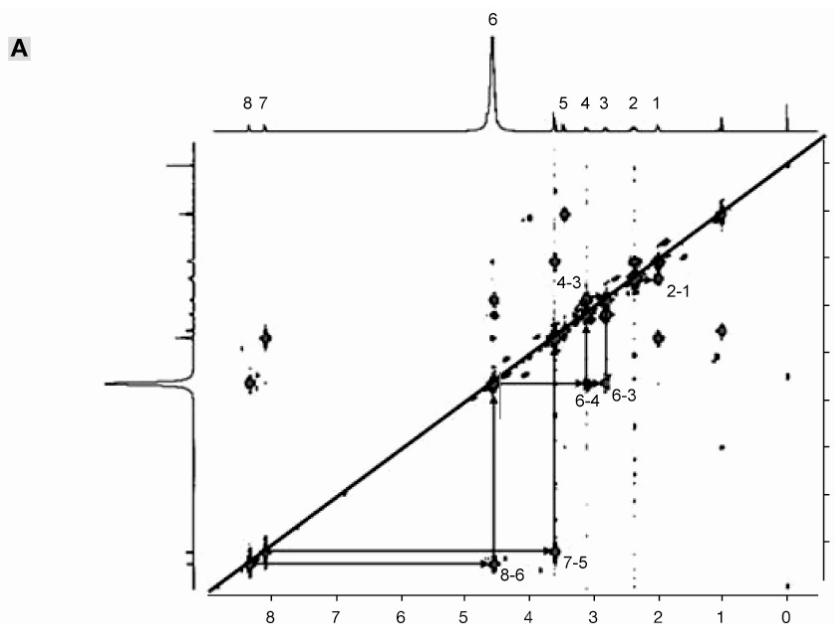


Figura 21. Asignación de las resonancias del espectro ^1H -RMN del glutathion oxidado (1M en agua, pH 4.5, 295 K). A. Espectro 2D-ge-COSY. En el diagrama de contorno los picos de la diagonal representan el espectro monodimensional y los picos cruzados los acoplamientos escalares H-H entre protones de la molécula

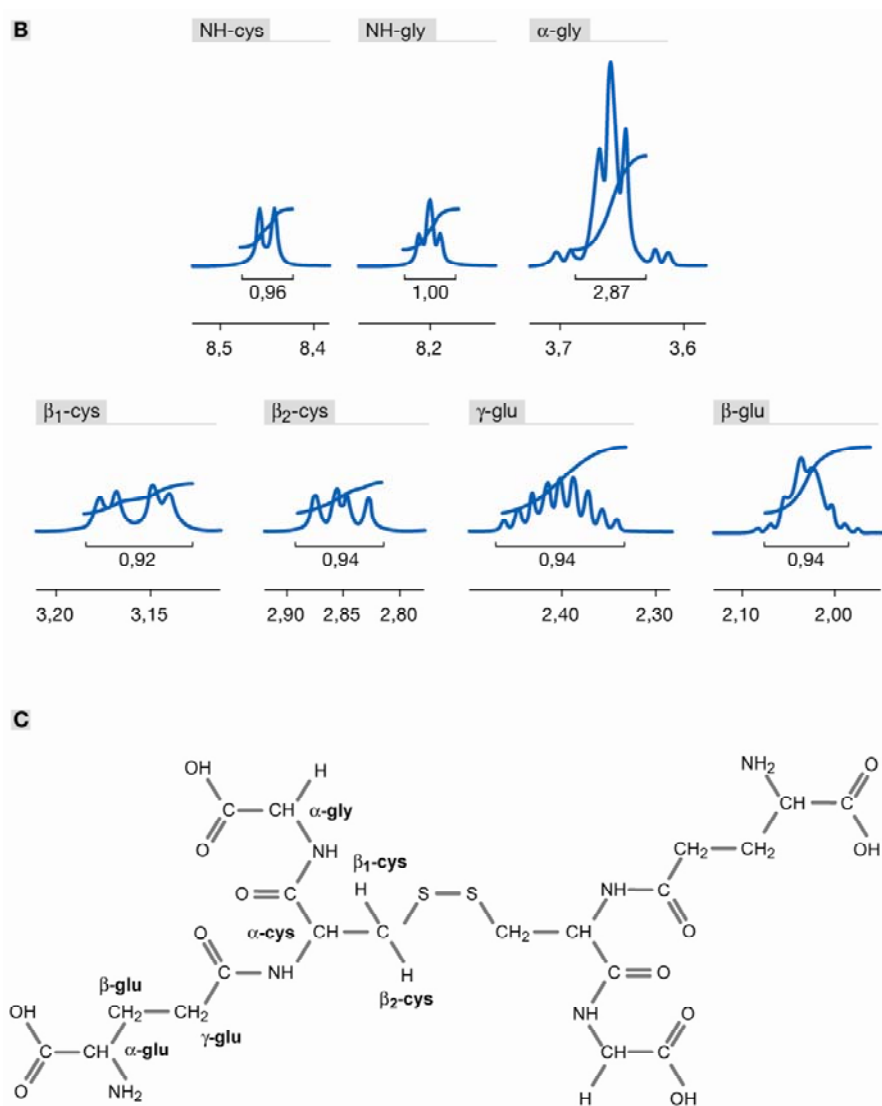


Figura 21.B. Estructura hiperfina de las señales de los grupos NH y NH₂ del glutathione. **C.** Asignaciones del espectro de ¹H-RM de la molécula del Glutathione oxidado a pH 4 y 295K.

4.1.2. Determinación del pK_a de los grupos NH del glutathione

El conocimiento de los valores del pK_a de los grupos NH de la cisteína y glicina sirvió para estudiar si se encontraban diferencias en la velocidad de intercambio de magnetización con las moléculas de agua debido a los estados de ionización de ambas poblaciones de protones involucradas en el intercambio. El experimento se realizó sobre disoluciones de glutathione 0.1M a distintos pH's (1.6-9.2). De cada solución a distinto pH se adquirieron en las mismas condiciones, espectros de ¹H de un pulso/adquisición con la secuencia explicada en la sección 3.3.1. El pK_a fue calculado con la ecuación de

Henderson-Hasselbach teniendo en cuenta que δ_{\max} y δ_{\min} corresponden al desplazamiento químico en los límites ácido y básico respectivamente:

$$pH = pK_a + \text{Log} \left(\frac{\delta_{\max} - \delta}{\delta - \delta_{\min}} \right) \quad [17]$$

Los resultados indicaron que los grupos NH de la glicina presentan un $pK_a=3.82$ y los de la cisteína de 4.73.

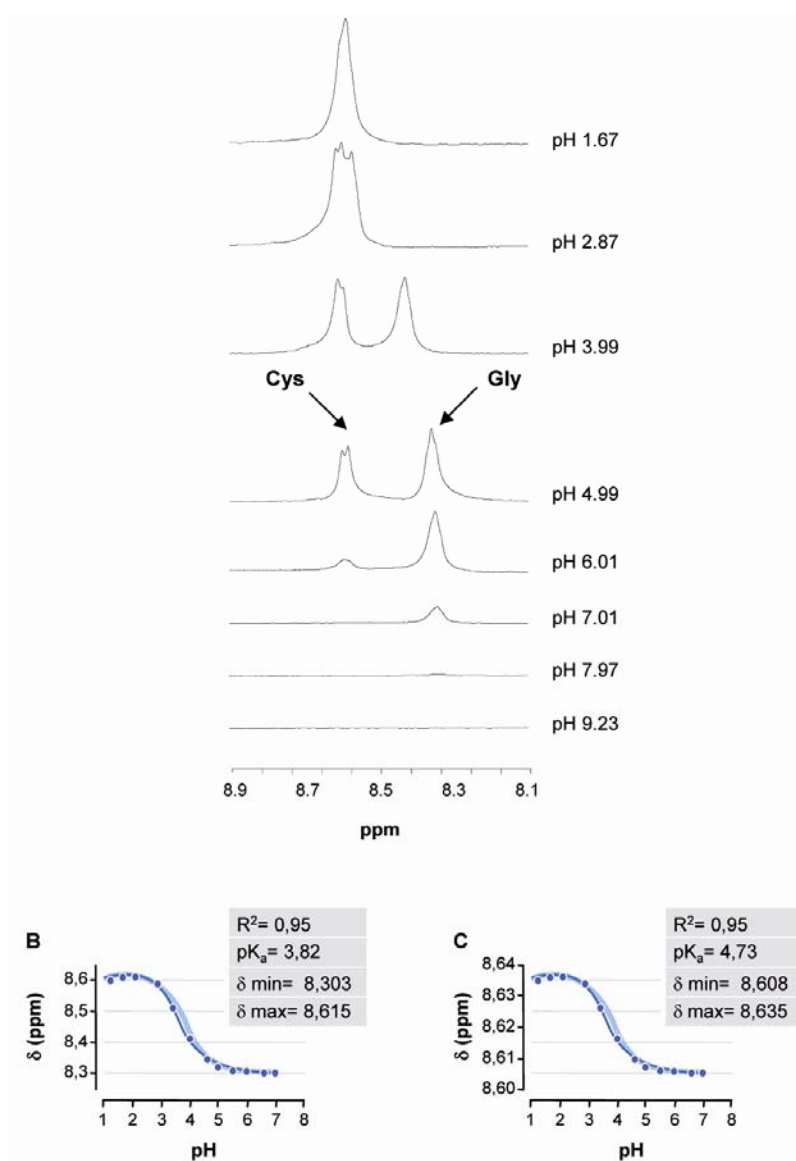


Figura 22. Titulación de pH de los grupos NH intercambiables del glutathione (0.1M, 295K). A. ^1H RMN de la región de los grupos NH de la glicina y cisteína en función del pH. **B.** Titulación del grupo NH de la glicina. **C.** Titulación del grupo NH de la cisteína. La determinación del pK_a se hizo ajustando los valores a la ecuación [17]

4.1.3. *Propiedades termodinámicas de la Transferencia de Magnetización. Modelo de Interacción molecular.*

4.1.3.1. Determinación de las variables termodinámicas

Los valores de las magnitudes termodinámicas ΔH , ΔS y ΔG del proceso de transferencia de magnetización determinan la espontaneidad de la reacción de intercambio entre las dos poblaciones de protones en equilibrio. Estos valores se determinaron adquiriendo espectros z de las soluciones de glutation 1M en diferentes condiciones de pH y temperatura como se indica en Métodos (sección 3.3.2.) (**Figura 23**). Los espectros muestran generalmente dos picos z : uno centrado aproximadamente a 4.5 ppm, que corresponde al intercambio de magnetización entre los protones de las moléculas de agua ligada al glutation y libre en disolución, y otro centrado a ~ 8 ppm que corresponde al intercambio entre los protones de los grupos NH del glutation y las moléculas de agua libre o ligada. Los dos picos z observados, aparecen solapados parcialmente por lo que resulta difícil establecer en una primera aproximación sus propiedades de frecuencia de máxima saturación y anchura a media altura. No obstante, la determinación de estos parámetros es posible llevarla a cabo ajustando los resultados experimentales de M_s/M_0 a la suma de dos lorentzianas que representan cada pico, como se indica en Métodos (sección 3.3.2).

La **Figura 23** muestra los espectros z más representativos a los tres pH's estudiados y a diferentes temperaturas. En la figura se observa que a pH ácido y alcalino la anchura del pico correspondiente a los intercambios H_2O-H_2O aumenta a medida que aumenta la temperatura, sin embargo, el comportamiento observado a pH neutro es opuesto a los anteriores: la anchura a media altura disminuye al aumentar la temperatura. También se observa que a pH 4 y 9 y a bajas temperaturas los dos picos de intercambio pueden separarse en dos lorentzianas, pero a una temperatura superior de los 315K, sobretodo a pH 4 los dos picos z coalescen en uno, debido al rápido intercambio entre ambos grupos. Este comportamiento dificulta la determinación de los parámetros b y d de ambos picos y hace difícil diferenciar los verdaderos intercambios entre $NH-H_2O$ o entre H_2O-H_2O . Esto también ocurre a pH 6.5 pero a bajas temperaturas.

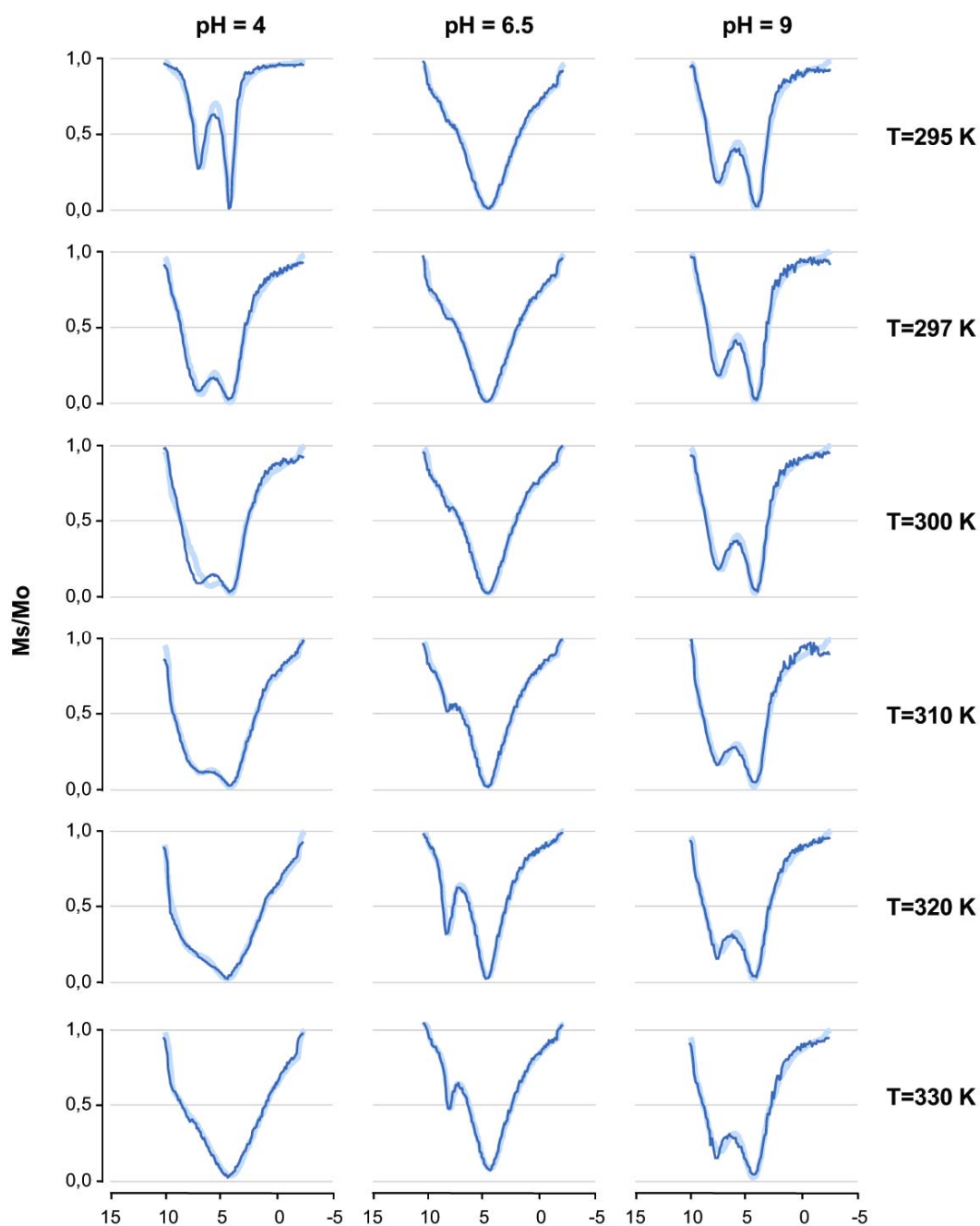


Figura 23. Espectros z de una solución 1M de glutatión a pH's 4, 6.5 y 9 en el intervalo de temperaturas 295-330K. La curva (—) representa los valores experimentales y la curva (—) representa los valores optimizados derivados del ajuste a la ecuación de doble lorentziana [10].

Los valores de anchura a media altura b y d (sección 3.3.2.) derivados del ajuste a diversos pH's y temperaturas, permiten calcular las variables termodinámicas ΔH , ΔS y ΔG del intercambio de magnetización. En particular, los valores de b determinados a varias temperaturas permitieron calcular las variables termodinámicas ΔH y ΔS del intercambio de magnetización entre las moléculas de agua libre y ligada (ΔH , ΔS : $H_2O_{\text{libre}}-H_2O_{\text{ligada}}$), mientras que los valores de d proporcionaron las variables termodinámicas para el intercambio entre los protones de las moléculas de agua libres con los protones NH del glutatión (ΔH , ΔS : $R\cdot NH-H_2O$). En todos los casos se aplicó el mismo método de cálculo. La **Tabla IX** recoge estos resultados para los intercambios $H_2O_{\text{libre}}-H_2O_{\text{ligada}}$ y $NH-H_2O$. Estos datos permiten calcular el cambio de energía libre ΔG y determinar la dirección de la espontaneidad en el proceso, estableciendo además si está dirigido entálpicamente o entrópicamente.

Tabla VI
Cambios de entalpía ΔH y entropía ΔS en los intercambios de
transferencia de magnetización $H_2O_{\text{ligada}}-H_2O_{\text{libre}}$ y $NH-H_2O_{\text{libre}}$

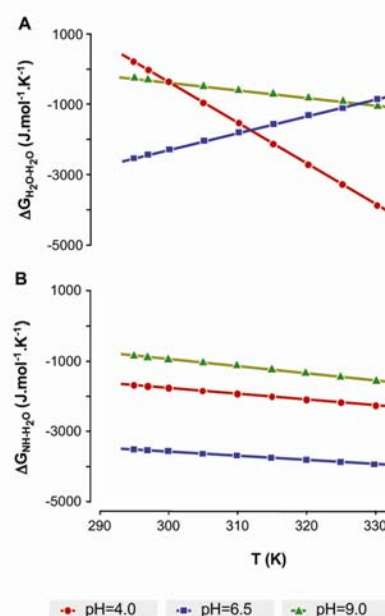
$H_2O_{\text{libre}}-H_2O_{\text{ligada}}$	ΔH (J. mol ⁻¹)	ΔS (J. mol ⁻¹)
pH=4.0	34700	116
pH=6.5	-16700	-48
pH=9.0	6373	22
$NH-H_2O$	ΔH (J. mol ⁻¹)	ΔS (J. mol ⁻¹)
pH=4.0	3180	16.5
pH=6.5	2.11	11.9
pH=9.0	5136	20.3

Los valores representados en la **Tabla VI** indican que la entalpía del intercambio ($H_2O_{\text{libre}}-H_2O_{\text{ligada}}$) es negativa a pH 6.5 y positiva a 4.0 y 9.0. Respecto a los valores de entalpía del intercambio entre el agua y los protones NH son positivos en todos los casos, aunque muy inferiores a pH 6.5 que pH 4.0 y 9.0. Por otro lado, los cambios de entropía en los intercambios $H_2O_{\text{libre}}-H_2O_{\text{ligada}}$ son negativos a pH neutro y positivos a pH alcalino ó ácido, indicando que estos intercambios son entrópicamente desfavorables sólo a pH

neutro. En el caso de los intercambios $\text{NH-H}_2\text{O}$ los cambios de entropía son positivos en todos los casos y resulta mayor en el pH más alcalino, indicando que este intercambio resulta más favorable entrópicamente al aumentar el pH. El conocimiento de las variables termodinámicas ΔH y ΔS , permite determinar el cambio de energía libre ΔG en cada intercambio y conocer la espontaneidad del proceso investigado (ecuación 9). Las **Figuras 24 A y B** muestran la variación de ΔG en el intercambio $\text{H}_2\text{O}_{\text{libre}}-\text{H}_2\text{O}_{\text{ligada}}$ y el intercambio $\text{NH-H}_2\text{O}$, respectivamente. Los cambios de energía libre son nulos o negativos en todos los casos, indicando que el proceso es espontáneo. Sin embargo, en los intercambios $\text{H}_2\text{O}_{\text{libre}}-\text{H}_2\text{O}_{\text{ligada}}$, los valores de ΔG se hacen más negativos al aumentar la temperatura a pH 4.0 y 9.0 y menos negativos al aumentar la temperatura a pH 6.5. Un aumento en la temperatura siempre hace aumentar la energía libre del proceso, sin embargo, en esta condición de pH el cálculo de la anchura a media altura del primer pico z (4.5 ppm) resultó complicado empleando el método de estimación de d debido al solapamiento de los dos picos. Esto implica una sobreestimación de las anchuras a media altura que proporciona un resultado poco fiable en el proceso, si bien, es importante indicar que el comportamiento a este pH es opuesto al encontrado en condiciones de pH ácido y alcalino.

Los resultados obtenidos indican que el proceso está dirigido entrópicamente en todos los casos, con cambios positivos de entropía a pH 4.0 y 9.0 y negativos a pH 6.5, como se había indicado. Por otro lado, en condiciones fisiológicas (pH próximo a la neutralidad y T próxima a 310K) el cambio de energía libre es ligeramente más negativo que a pH's más ácidos o alcalinos, indicando que el proceso resulta termodinámicamente más favorable en estas condiciones.

Figura 24. Variación de ΔG ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) en función de la temperatura en los intercambios $\text{H}_2\text{O}_{\text{libre}}-\text{H}_2\text{O}_{\text{ligada}}$ (A) y $\text{NH-H}_2\text{O}$ (B) a pH ácido, neutro y alcalino.



En los intercambios NH-H₂O se observan también valores negativos de ΔG que disminuyen al aumentar la temperatura. Esto indica que el proceso es espontáneo en este rango de temperaturas y transcurre con un incremento de entropía en todos los casos. En condiciones fisiológicas, los valores de ΔG NH-H₂O son más negativos que los valores de ΔG H₂O_{libre}-H₂O_{ligada}, indicando que los intercambios entre los grupos NH y el agua resultan más favorables energéticamente que los de H₂O_{libre}-H₂O_{ligada} en estas condiciones.

En resumen, nuestros resultados indican que el proceso de transferencia de magnetización transcurre espontáneamente en todas las condiciones de pH y temperatura, siendo más favorable en condiciones fisiológicas para los intercambios NH-H₂O que para los intercambios H₂O_{libre}-H₂O_{ligada}. El proceso de intercambio H₂O_{libre}-H₂O_{ligada} está dirigido entrópicamente y progresa con cambios positivos en entropía a pH 4.0 y 9.0 al aumentar la temperatura y con cambios negativos en entropía a pH 6.5. El proceso de intercambio NH-H₂O está dirigido entrópicamente y presenta cambios positivos de entropía en todo el rango de pH investigado.

4.1.3.2. Mapas de interacción molecular glutation-agua

Con objeto de comprender mejor los mecanismos de la transferencia de magnetización entre los protones intercambiables del glutation oxidado y el agua, llevamos a cabo, por primera vez hasta donde conocemos, una serie de cálculos de química computacional para determinar la distribución más favorable de moléculas de agua sobre la superficie molecular del glutation. Conviene comenzar especificando aquí, que la interacción de las moléculas de agua con la molécula de glutation no es uniforme, resultando más favorable en unas regiones de la molécula que en otras y dependiendo de las propiedades electrónicas de las funcionalidades presentes. Así, ciertas zonas del péptido presentan una interacción más fuerte con el agua, con una mayor probabilidad de que las moléculas de agua se acomoden de forma más favorable sobre ellas (Goodford, 1985). La **Figura 25** indica la numeración empleada en la computación de la energía de interacción sobre cada punto.

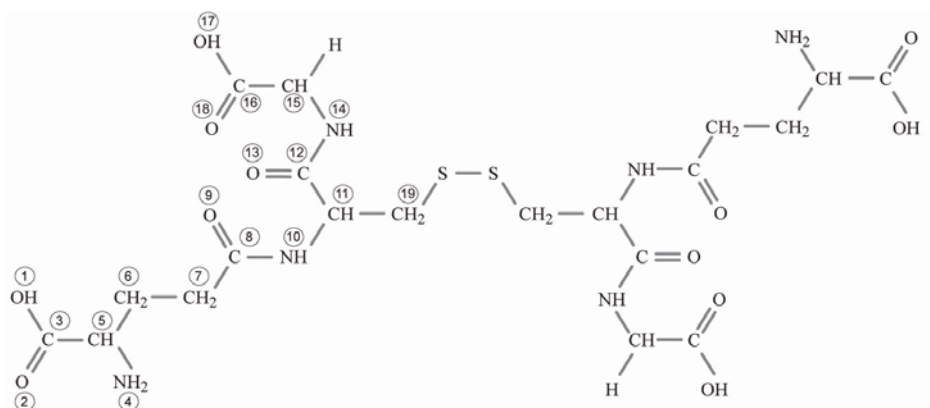


Figura 25. Numeración utilizada en el cálculo de la energía de interacción entre cada átomo y las moléculas de agua.

Con respecto al estado completamente protonado A (sección 3.4), no se muestran los resultados ya que los cálculos de estabilidad realizados a nivel mecano-cuántico (B3LYP/6-31G*/CPCM) indican que el equilibrio entre las formas A y B en disolución acuosa se encuentra muy desplazado hacia la forma zwitteriónica, sugiriendo que la presencia de A es muy minoritaria ($\Delta G = -69.9 \text{ kJ.mol}^{-1}$)

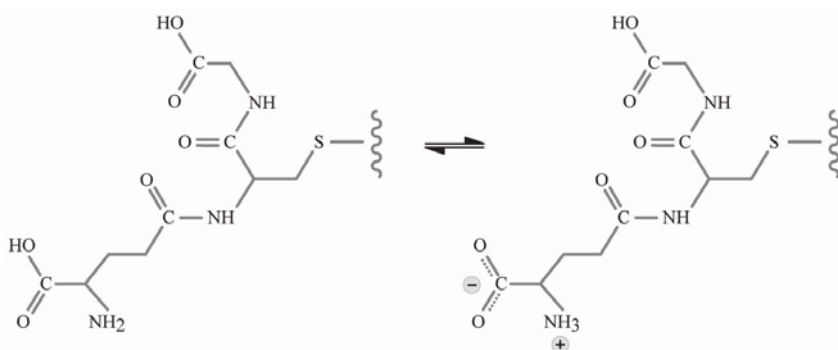


Figura 26. Equilibrio entre el estado protonado y zwitteriónico en disolución acuosa. La estructura de la izquierda corresponde al estado protonado o forma A y la de la derecha corresponde al estado desprotonado o forma B

En definitiva, nuestros cálculos sugieren que en condiciones de neutralidad el glutámico se encuentra preferentemente en forma de zwitterión porque es la forma termodinámicamente más estable en medio acuoso como indica la **Figura 26** (B es 69.9 kJ.mol^{-1} más estable que A). Además, el pK_a del grupo C-terminal de la glicina es asimismo bajo (**Figura 22**), por lo que es lógico suponer que en disolución acuosa próxima a la neutralidad, esté también desprotonado. Por ello, las estructuras más probables en el rango de pH 4.0-9.0 investigado en este estudio, fueron las formas B y C

correspondientes al zwitterión y al péptido completamente ionizado (sección 3.4) tal y como se muestran en la parte superior de la **Tabla VII**.

La estimación de la distribución espacial de las moléculas de agua se realizó con el programa GRID (Molecular Discovery Ltd., Londres, UK). Esta metodología permite calcular la energía de interacción de una sonda de interés (agua en este caso) sobre cada punto de una malla imaginaria tridimensional construida sobre la molécula diana (glutation) (Goodford, 1985). La energía de interacción glutacion-agua así calculada depende de tres términos: el debido a la formación de enlaces de hidrógeno, el término electrostático y el potencial de Lennard-Jones, siendo el más importante el primero. Una vez determinada la energía de interacción en cada punto de la malla, se construyen los mapas MIF (Cruciani, 2005) como contornos de isoenergía, es decir, por unión de los puntos con la misma energía de interacción sobre la molécula diana. Las interacciones favorables dan lugar a energías atractivas (negativas), de tal manera que aquellas regiones sobre la estructura del glutacion en las que la energía de interacción sea más negativa indican las zonas más favorables para acomodar las moléculas de agua. Así, es posible predecir empleando esta metodología las zonas de la superficie del glutacion, más favorables a la solvatación con H₂O.

La **Tabla VII** recoge las energías de interacción calculadas sobre cada uno de los átomos investigados en los dos estados de ionización B y C. Estos resultados pueden visualizarse gráficamente a partir de los mapas construidos a distintos valores de energía (**Figura 27**). Siguiendo la numeración de la **Figura 25**, las posiciones más favorables varían de manera paralela, en ambas especies.

Con respecto al estado B: las posiciones más favorables para acomodar a las moléculas de agua son:

- Alrededor del O de (H)O¹ (glutámico), del H de HN⁴ (glutámico) y del protón en HO¹⁷ (glicina). Debido a la protonación del resto amino terminal, se induce la formación de un puente de hidrógeno fuerte con el carbonilo del grupo C-terminal, que estabiliza la conformación y limita la flexibilidad molecular. Al tratarse de una estructura con separación formal de cargas, se produce una solvatación más eficiente con el disolvente polar (agua) sobre estos grupos con respecto a la forma no-zwitteriónica (A, sección 3.4). Así las interacciones más favorables tendrán lugar sobre estos grupos terminales cargados, mientras que otros grupos funcionales van a aparecer poblados a valores de energía menos

favorables. Estos valores mínimos de energía de interacción ($\sim -71.1 \text{ kJ.mol}^{-1}$) pueden asemejarse a la formación de dos enlaces de hidrógeno entre la molécula diana y la sonda.

- Seguidamente el agua se distribuiría alrededor del H de HN^{14} de la glicina. La interacción con moléculas de agua está además, favorecida por la presencia del grupo NH_3^+ . La flexibilidad molecular impuesta en el cálculo de los mapas da lugar a la distribución característica mostrada (energía $> -54.81 \text{ kJ.mol}^{-1}$).

- Posteriormente, el agua se distribuiría alrededor del protón del grupo amino HN^{10} de la cisteína pero de forma menos favorable (energía de interacción menos negativa). En este sentido, la formación del puente de hidrógeno intramolecular entre los grupos NH_3^+ y carboxílico terminales dificulta la rotación del enlace $\text{C}^6\text{--C}^7$ para inducir la entrada de moléculas de agua sobre esta región (como podría ocurrir en el caso del protón del grupo HN^{14}).

Con respecto al estado de ionización C, en los mapas obtenidos se observa una distribución paralela a la discutida en la forma zwitteriónica B, aunque los valores de energía son ligeramente más favorables. En este caso, las posiciones con mayor afinidad para acomodar a las moléculas de agua son las siguientes:

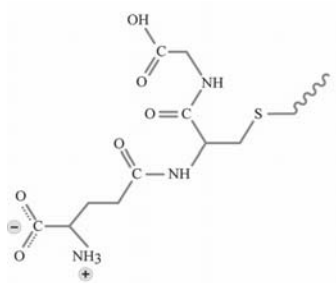
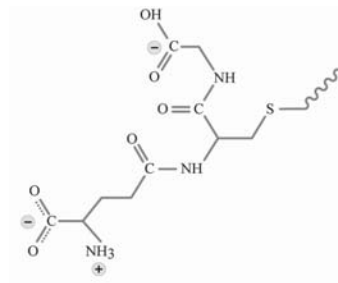
- Alrededor del O de $(\text{H})\text{O}^1$ (glutámico), del H de HN^4 (glutámico) y del protón en $(\text{H})\text{O}^{17}$ (glicina). En este caso, la estructura optimizada en disolución acuosa indica que el puente de hidrógeno intramolecular entre los grupos terminales amino protonado y C-terminal resulta más fuerte (1.78\AA) que en la forma B. Esto indica que podría limitar la libertad conformacional de manera más acusada.

- Alrededor del H de HN^{14} : al igual que para la forma B, la siguiente zona molecular más poblada aparece sobre el protón del grupo amino de la glicina. Análogamente, la presencia del grupo NH_3^+ favorecería la interacción con moléculas de agua.

- Alrededor de HN^{10} : finalmente, el grupo amino de la cisteína presenta valores de energía de interacción considerablemente negativos, por lo que puede acomodar moléculas de agua aunque de forma menos favorable que las anteriores.

Considerando el estudio sobre los dos protones de los enlaces peptídicos, el protón del grupo amino de la glicina muestra una energía de interacción más favorable con las moléculas de agua que el correspondiente a la cisteína.

Tabla VII
Estudio de la energía de interacción con el solvente (en kJ mol^{-1})
en la molécula de glutatión en disolución acuosa

Forma B**Forma C**

<i>Grupo</i>	<i>Átomo</i>	<i>Energía de interacción¹</i> <i>($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)</i>	<i>Distancia en el punto de mínima energía (Å)</i>	<i>Energía de interacción¹</i> <i>($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)</i>	<i>Distancia en el punto de mínima energía (Å)</i>
O ¹	O	-72,0	2.81	-77,8	2.73
	H	-		-	
O ²	O	-46,4		-49,4	
H ₂ N ⁴	N	-		-	
	H	-72,0 ^a	2.18	-77,8 ^a	2.09
	H'	-56,9 ^b		-61,1 ^b	
	H''	-43,9		-51,9	
HC ⁵	H	-45,2		-52,7	
H ₂ C ⁶	H	-45,2		-52,7	
	H'	-30,1		-37,2	
H ₂ C ⁷	H	-44,4		-51,9	
	H'	-33,9		-41,4	
O ⁹	O	-56,9		-61,1	
HN ¹⁰	N	-		-	
	H	-50,6 ^c		-54,4 ^c	
HC ¹¹	H	-51,9		-53,6	
O ¹³	O	-46,0		-53,1	
HN ¹⁴	N	-21,3		-29,3	
	H	-56,9 ^b		-61,1 ^b	
H ₂ C ¹⁵	H	-35,6 ^d		-42,3 ^d	
	H'	-13,0		-22,6	
C ¹⁶		-		-	
O ¹⁸	O		2.87		2.78
		-72,0		-77,8	
HO ¹⁷	O ²	-		-	
	H	-72,0	2.96	-	

^{a, b, c y d} corresponden a los valores de energía que se representan en los MIF de la **Figura 27**.

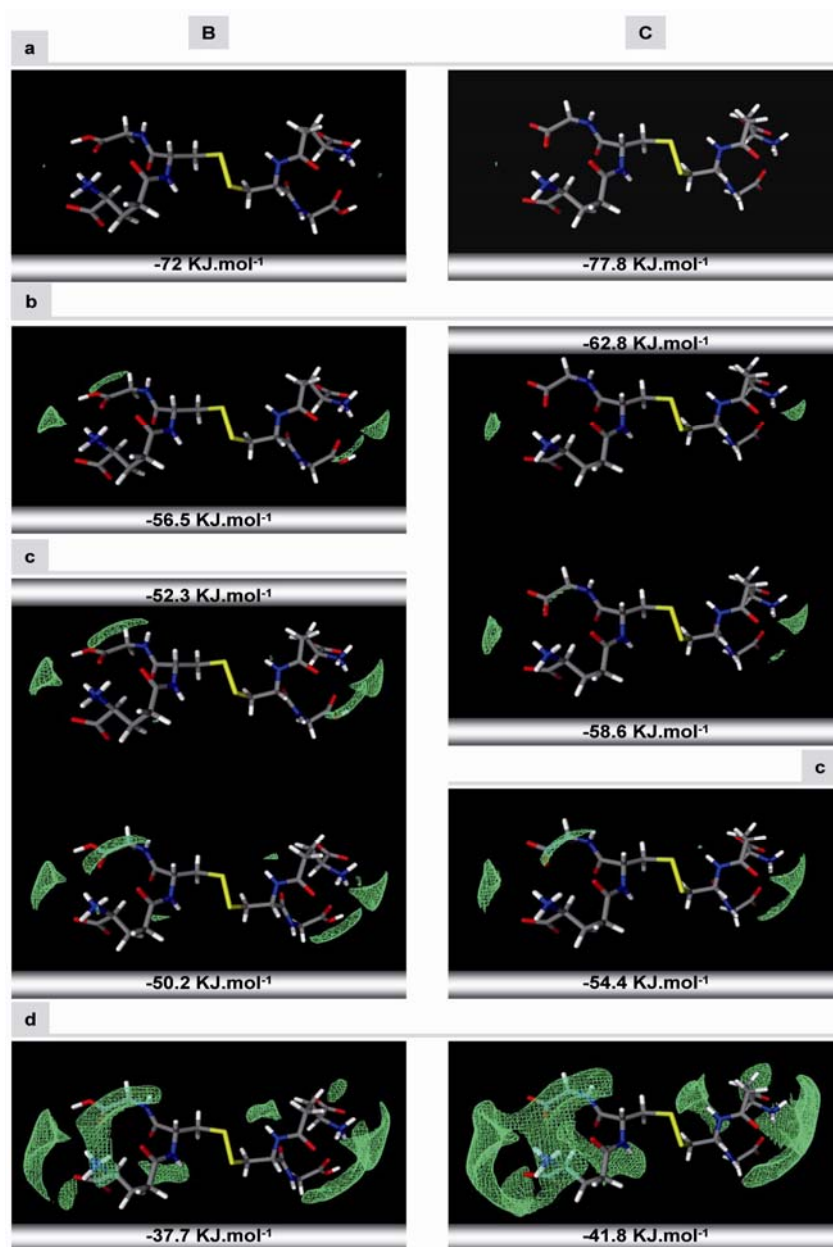


Figura 27. Mapas de Interacción Molecular glutation-agua a diferentes valores de isoenergía de interacción en las dos formas zwitteriónicas B y C. Los paneles de la izquierda corresponden a los MIF del estado B y los de la derecha al estado C. Los mapas MIF computados se muestran como superficies en verde indicando regiones con la energía de interacción indicada en cada panel (a, b, c, d). Los valores de energía y distancias aparecen en la **Tabla VII**. Se muestran los mapas más representativos y los correspondientes al estudio de la distribución de moléculas de agua alrededor de los grupos NH de la cisteína y glicina y NH₂ del glutámico; **a** representa el MIF donde la energía de interacción es más negativa: alrededor del O¹ y uno de los protones del grupo H₂N⁴ del glutámico, **b** y **c** representan al intervalo de energía calculada para los grupos NH, concretamente: **b** corresponde al MIF que revela la interacción sobre el H' del H₂N⁴ del glutámico y del H del NH de la glicina y **c** al MIF que indica interacción alrededor del H del NH de la cisteína, **d** ilustra el MIF con un valor de energía de interacción menos favorable, en este caso, las moléculas tienden a distribuirse alrededor de uno de los protones del H₂C¹⁵ de la glicina.

Para que una interacción intermolecular tenga lugar y sea efectiva resulta fundamental que sea favorable desde el punto de vista energético (mapas MIF). No obstante, ésta es una condición necesaria aunque no suficiente ya que además dicha interacción debe ser posible desde el punto de vista estérico. En este sentido, resulta importante conocer la disposición y accesibilidad del átomo de H del grupo NH de la glicina y de la cisteína. La siguiente figura muestra la estructura del glutathion desprotonado en el carboxílico de la glicina y con el glutámico en forma de zwitterión (conformero C). Ambas moléculas están representadas con los radios de van der Waals de forma que se asemeja al tamaño del glutathion que “ven” las moléculas de agua.

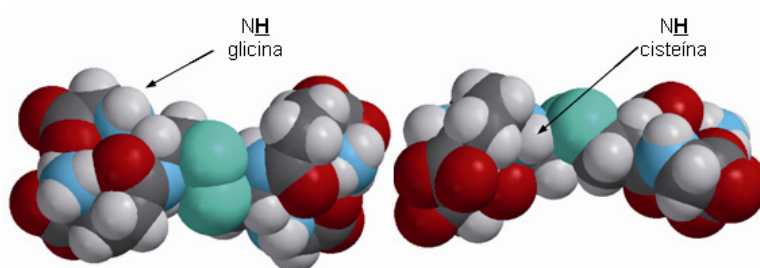


Figura 28. Estructura desprotonada de la molécula de glutathion en forma zwitteriónica vista desde dos perspectivas. El protón del grupo NH la glicina queda expuesto hacia el exterior, mientras que el de la cisteína aparece más confinado y por tanto resulta menos accesible para las moléculas de agua.

Teniendo en cuenta las posiciones de mínima energía y las distancias calculadas entre agua y glutathion en el punto de mínima energía (**Tabla VII**), así como los factores estéricos mencionados, los resultados obtenidos se correlacionan positivamente con los sitios de intercambio.

4.1.4. Influencia de la microviscosidad del medio y del coeficiente de difusión translacional

4.1.4.1. Influencia de la microviscosidad

La difusión translacional de las moléculas de agua a través del medio puede favorecer o dificultar los intercambios químicos de protones entre dos sitios y las transferencias de magnetización entre ambos. Sin embargo, este aspecto no ha sido investigado en detalle previamente, hasta donde conocemos. En esta sección se aborda este aspecto, investigando la influencia de la microviscosidad del entorno sobre las transferencias de magnetización en soluciones modelo de glutathion y su relación con el

coeficiente de difusión translacional del agua. Más concretamente, se determinó el coeficiente de difusión translacional del agua (ADC) en disoluciones de glutathione 1M conteniendo concentraciones crecientes de glicerol (0, 15, 33 y 50% v/v, pH 7 y T=310K). Estos valores de ADC se correlacionaron con los tiempos de relajación T_1 del agua y con el porcentaje de transferencia de magnetización en cada una de las disoluciones investigadas.

La **Figura 29** muestra los espectros z y los valores de ADC obtenidos con las distintas concentraciones de glicerol. También muestra los espectros de ^1H RMN de la región NH (panel superior). El incremento en la concentración de glicerol origina una serie de cambios en las resonancias NH del glutathione. En particular, la resonancia de la cisteína a 8.3 ppm aumenta de área con respecto al agua, mientras que la de la glicina a 8.0 ppm no se modifica apreciablemente. Con respecto al % TM en los espectros z , la altura del pico z del intercambio NH- H_2O a 8 ppm disminuye desde un 73% a un 17%, cuando la concentración de glicerol aumenta de 0 a 50% respectivamente. Estos resultados indican que un aumento en la microviscosidad disminuye la transferencia de magnetización, principalmente entre los protones NH de la cisteína y el agua. Como se indicó en la **Figura 28**, el grupo NH de la cisteína está más influenciado por el descenso del número de moléculas de agua que el de la glicina. Al tener una energía de interacción menor (**Tabla VII**), se ve más afectado por el incremento de la concentración de glicerol. Los paneles inferiores describen la caída exponencial de la amplitud de la señal del agua con respecto al parámetro b (s/mm^2). Los valores del coeficiente de difusión aparente (ADC) se calcularon a partir de estos datos empleando la ecuación de Stejskal-Tanner como se indica en Métodos [8].

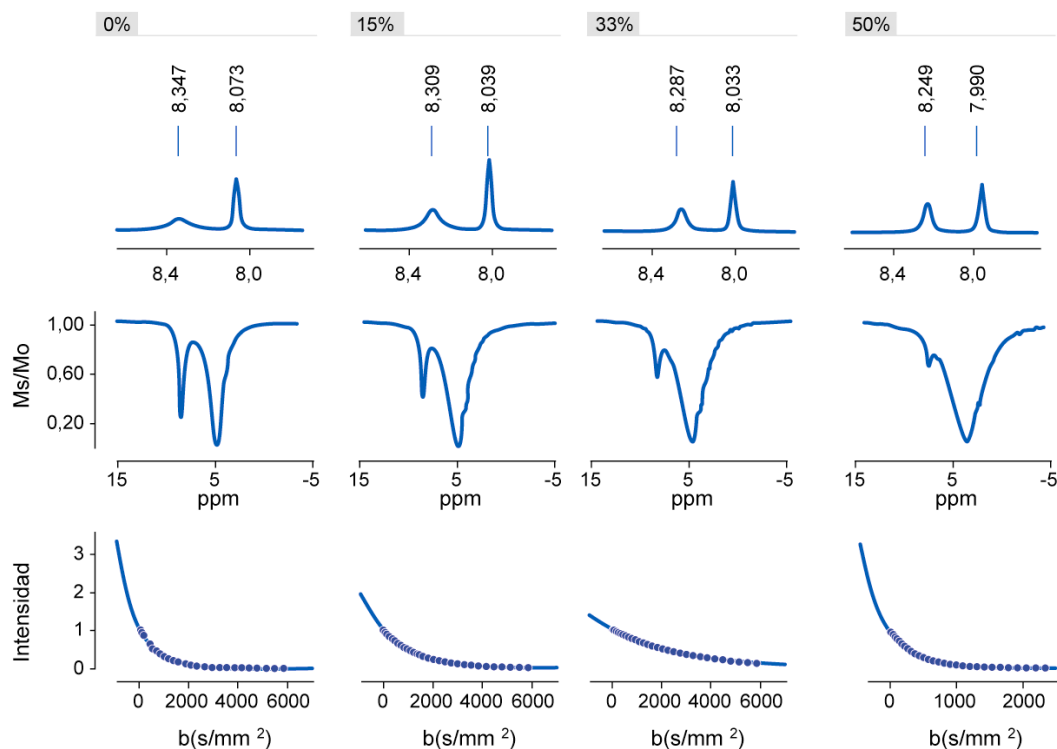


Figura 29. Influencia de la microviscosidad en la variación del ADC y % TM para diversas concentraciones de glicerol. Las soluciones modelo utilizadas contienen glutation 1M y concentraciones crecientes de glicerol (0%, 15%, 33% y 50% v/v). Los paneles superiores muestran los espectros de ^1H correspondientes a la región NH, los intermedios los espectros z correspondientes y los inferiores la caída exponencial de la amplitud de la señal frente a los valores de b (s/mm^2).

La **Figura 30** muestra las correlaciones entre las variaciones observadas en el ADC del agua (mm^2/s), el %TM y los valores de T_1 (s) en función de la concentración de glicerol añadida a la disolución de glutation 1M.

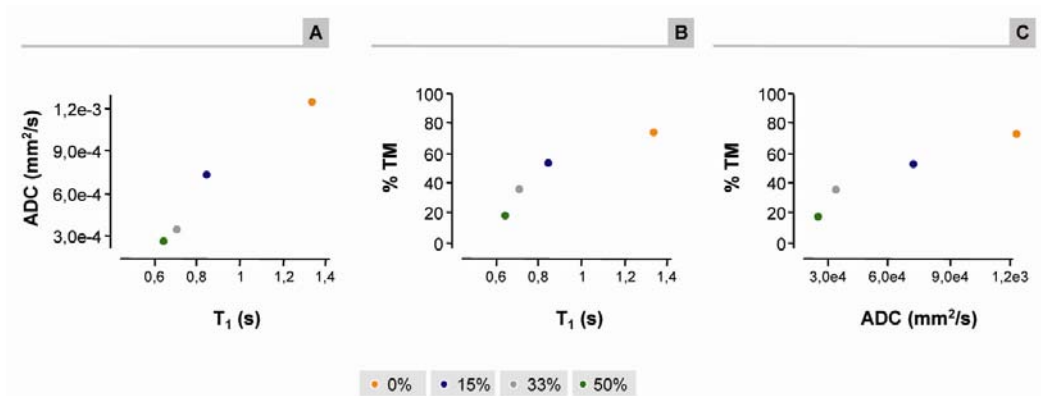
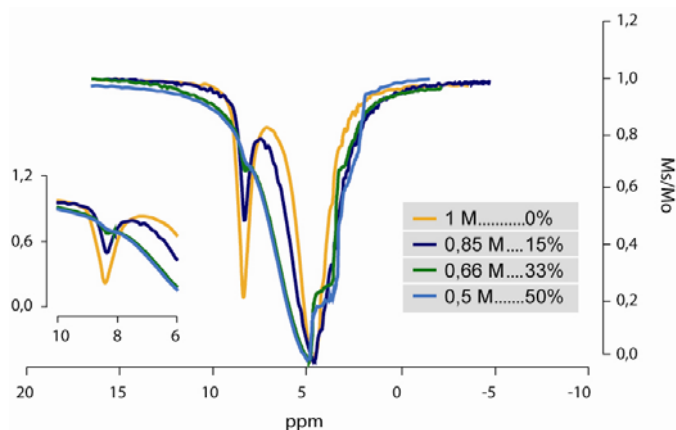


Figura 30. Variación del ADC, %TM, y T_1 del agua en soluciones de glutathione 1M (pH 7.0, $T = 310$ K) en función de la concentración de glicerol (% v/v) (en las tres gráficas la variación en la concentración de glicerol sigue la misma variación que aparece en el panel central).

La **Figura 30** muestra que al aumentar la concentración de glicerol, se produce una disminución en los valores de T_1 , ADC y % TM. La presencia del agente limita el movimiento rotacional y translacional de las moléculas de agua, así como los intercambios de magnetización. Sin embargo, los resultados de este experimento resultan difíciles de interpretar, pues al aumentar la concentración de glicerol se produce inevitablemente una disminución de la concentración de agua haciendo que disminuya la relación glutatión/agua. Esto permitiría explicar alternativamente los resultados obtenidos como un efecto indirecto de la disminución de la concentración relativa de agua, más que como efectos directos del incremento de microviscosidad y disminución del ADC. Para obtener una respuesta menos ambigua, realizamos un segundo experimento en el que se mantuvo constante la proporción de glutatión-agua (1M, 0.85M, 0.66M y 0.5 M) en presencia de las mismas cantidades de glicerol (0, 15, 33 y 50% v/v, respectivamente). La **Figura 31** representa los espectros z obtenidos en estas condiciones. Se puede observar que el pico z centrado a 4.5 ppm, correspondiente al intercambio $H_2O_{libre}-H_2O_{ligada}$, aumenta de anchura a medida que aumenta la concentración de glicerol. Sin embargo, el comportamiento del segundo pico z , centrado a 8 ppm disminuye al aumentar la concentración de glicerol, disminuyendo asimismo el porcentaje de TM desde un 73% a un 25% para concentraciones de glicerol del 0 y 50% v/v, respectivamente. Este experimento muestra también la aparición de un intercambio de magnetización con los grupos OH del glicerol, centrado a 3.8 ppm, que aumenta con la concentración de glicerol. Es posible que la disminución del intercambio $NH-H_2O$ contenga en parte un efecto competitivo con el $OH-H_2O$.

Figura 31. Variación de los espectros z de soluciones de glutatión y glicerol (pH 7.1, $T=310K$) manteniendo constante la relación glutatión- H_2O . Al aumentar la concentración de glicerol, disminuye el intercambio entre los grupos NH del glutatión y el agua. Sin embargo, aumenta el intercambio con los grupos $-OH$ del glicerol.



La **Figura 32** muestra de forma similar a la **Figura 30** la variación de los tres parámetros investigados manteniendo constante la relación glutatión-agua.

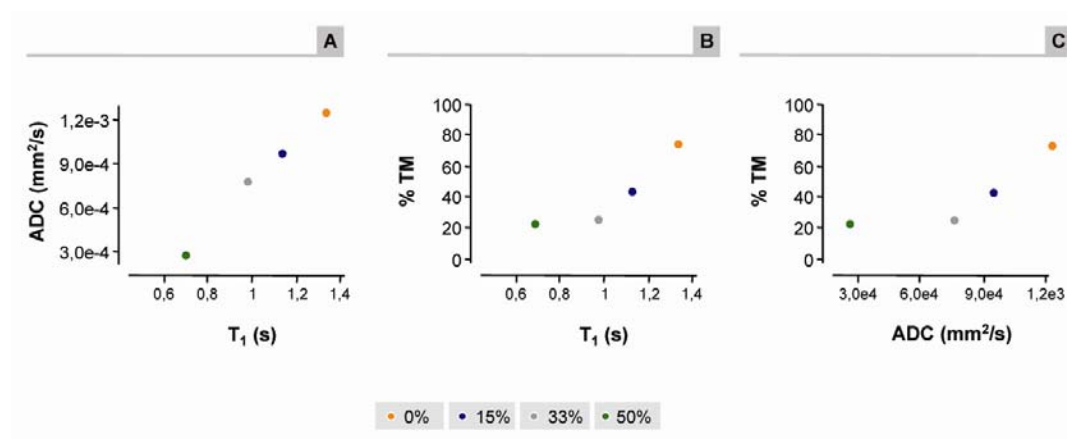


Figura 32. Variación del ADC, %TM y T₁ en soluciones de glutatión, manteniendo constante la relación glutatión y agua y añadiendo concentraciones crecientes de glicerol a pH 7 y 310K. La proporción de glicerol que indica el panel central es válida también en el panel izquierdo y en el derecho.

En este segundo experimento, se observa el mismo efecto que en el caso anterior. Se produce una disminución de los valores de ADC, %TM y T₁ al aumentar la concentración de glicerol. En resumen, estos resultados demuestran que la microviscosidad del medio y el coeficiente de difusión translacional del agua, condicionan de manera importante el proceso de transferencia de magnetización.

4.1.4.2. Energía de Activación de la difusión translacional

Una vez demostrada la influencia de la difusión translacional del agua en los procesos de Transferencia de Magnetización, se investigó la influencia del pH y la temperatura sobre este efecto. En primer lugar, se determinó la energía de activación necesaria para que se produjese el movimiento translacional de las moléculas de agua en presencia y ausencia de agente viscosizante (0 y 50% Glicerol) a diferentes pH's (ácido, neutro, alcalino) y temperaturas (298, 310, 330K).

El ADC del agua se determinó por la ecuación de Stejskal-Tanner [8] (sección 3.3.1). La **Tabla VIII** muestra los valores de ADC del agua en diversas condiciones de pH (4, 7 y 9), y temperatura (298, 310 y 330K), en disoluciones de glutatión 1M en presencia y ausencia del agente viscosizante (glicerol, 50% v/v). Como control, se determinó también el ADC del agua en ausencia y presencia del 50% de glicerol.

Tabla VIII
ADC's del agua en soluciones de Glutation 1M en ausencia (0%) y
presencia (50%) de Glicerol

T (K)	Agua (pH neutro)		1M glutatión pH 4.0		1M glutatión pH 7.0		1M glutatión pH 9.0	
	0%	50%	0%	50%	0%	50%	0%	50%
298	2.17±0.10	0.35±0.10	0.87±0.01	0.12±0.01	0.75±0.01	0.14±0.01	0.73±0.01	0.15±0.01
310	3.05±0.10	0.61±0.10	1.29±0.02	0.22±0.01	1.24±0.02	0.26±0.01	1.10±0.01	0.19±0.01
330	18.60±2.00	15.10±1.30	2.33±0.01	0.49±0.02	1.93±0.04	0.13±0.01	1.88±0.01	0.45±0.01

En general el ADC del agua, tanto sola como en soluciones 1M de glutatión, se incrementó con la temperatura.

Estos resultados permitieron calcular la energía de activación del proceso de difusión mediante la ecuación [13] (sección 3.3.3)

Tabla IX
 E_a (kJ.mol⁻¹) de la difusión translacional del agua pura en soluciones de
glutatión 1M en presencia y ausencia de glicerol a diversos pH's

	0% glicerol	50% glicerol
pH=4.0	25.22	36.16
pH=7.0	23.69	67.63
pH=9.0	24.01	29.08
H ₂ O	56.58	118.25

En presencia de glicerol, los valores de la E_a son mayores que en su ausencia, ya que en este caso se requiere más energía para conseguir que las moléculas de agua puedan desplazarse. La difusión translacional es un proceso limitante cinéticamente en el intercambio de magnetización.

Finalmente, se realizó en las mismas soluciones un experimento para correlacionar la variación de ADC, T_1 y porcentaje de transferencia de magnetización en el intercambio NH-H₂O (medida de c , sección 3.3.2.). Los valores de % TM se corrigieron con respecto a la región simétrica del espectro z para restar los efectos de saturación directa del agua. La

Figura 33 muestra estos los resultados en función del pH y de la temperatura, en presencia y ausencia del agente viscosizante (50% glicerol v/v).

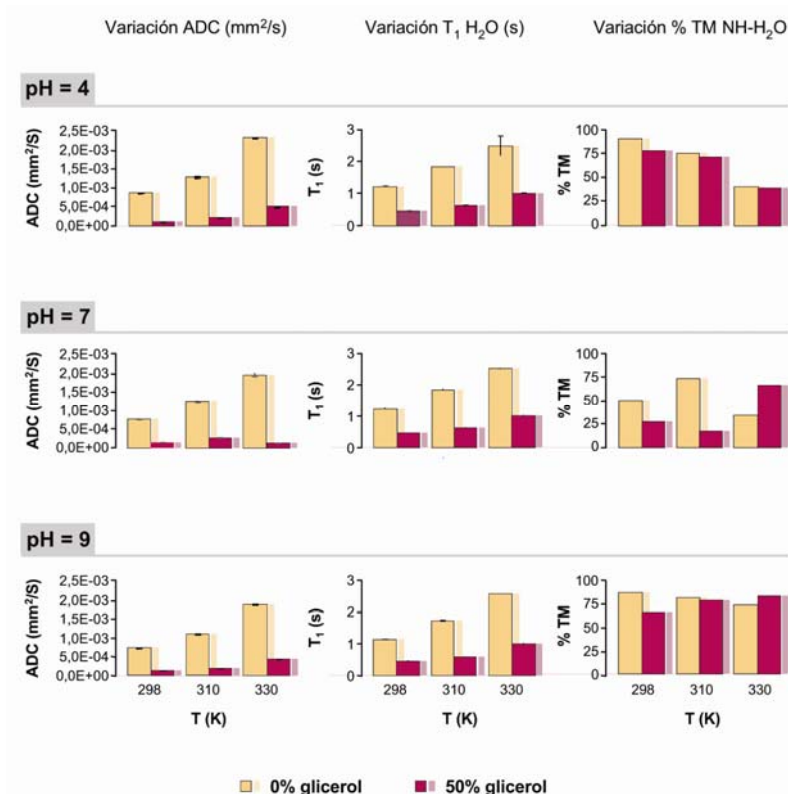


Figura 33. Variación de ADC, T₁ y %TM en el intercambio NH-H₂O en disoluciones de Glutathione 1M en ausencia y presencia de 50% Glicerol, a pH 4, 7 y 9 y a temperaturas de 298, 310 y 330K.

El ADC aumenta con la temperatura a los tres pH's, si bien el aumento en presencia de glicerol es inferior al observado en su ausencia. Esto indica que la presencia de glicerol dificulta el incremento de movilidad translacional del agua debido a la temperatura. En particular, a pH 7.0, la presencia de glicerol al 50% parece inhibir por completo el incremento de movilidad translacional del agua debido al incremento de temperatura. Los valores de T₁ del agua aumentan con la temperatura a los tres pH's, siendo menor este aumento en presencia de glicerol al 50%. Junto con los anteriores, estos resultados indican que el glicerol disminuye los movimientos de translación y rotación de la molécula de agua en disolución. Finalmente, la tasa de transferencia de magnetización presenta una relación compleja con el pH y la temperatura. Para explicar este fenómeno la **Figura 34** representa los espectros z a los tres pH's y las tres temperaturas estudiadas en el experimento en presencia y ausencia de 50% de glicerol.

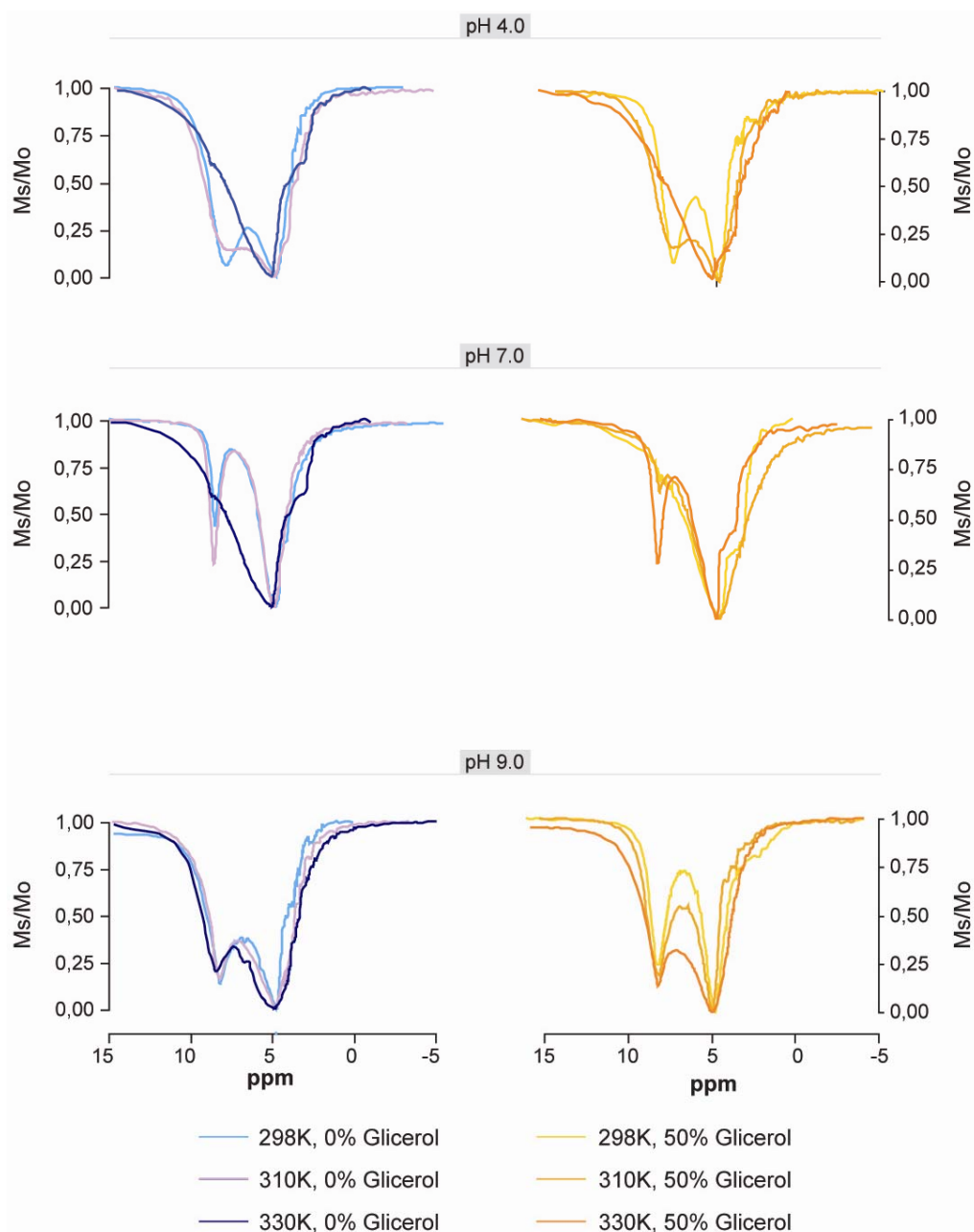


Figura 34. Variación de los espectros z a distintos pH's y temperaturas en presencia y ausencia de 50% de glicerol

Con las dos figuras anteriores es posible explicar el comportamiento que se observa sobre los intercambios de magnetización a distintas condiciones. A pH 4.0, el porcentaje de TM debido a los intercambios $\text{NH-H}_2\text{O}$ disminuye al aumentar la temperatura ya que se produce un incremento en el intercambio entre los protones de las moléculas de agua. Los dos picos del espectro z coalescen en un solo pico centrado a 4.7 ppm. En este caso el comportamiento de la TM es opuesto al observado en el ADC y T_1 . A

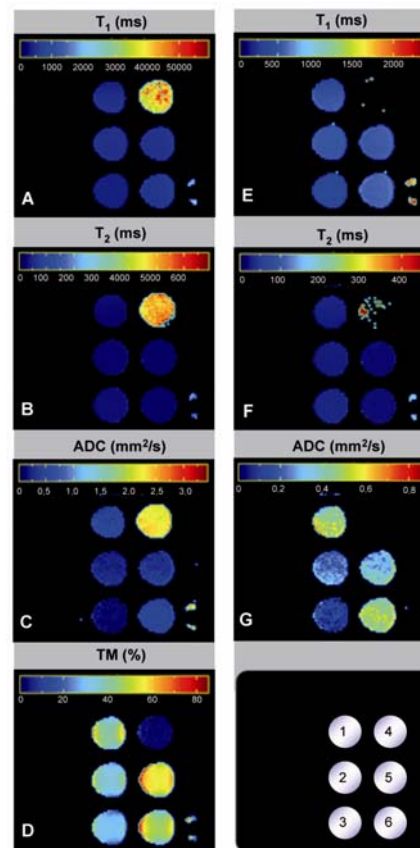
pH 9.0, el % TM (medida de c) parece disminuir al aumentar la temperatura y en ausencia de glicerol y en presencia de glicerol aumenta ligeramente con la temperatura. Sin embargo, en los espectros z se observa que en ausencia de glicerol, en las tres temperaturas del estudio los intercambios entre ambos grupos son similares en anchura y altura del pico. En cambio en presencia de glicerol, a medida que aumenta la temperatura, la anchura de los picos de intercambio aumenta. Finalmente a pH 7.0 existe un comportamiento bifásico con un máximo y un mínimo, para las soluciones en presencia y ausencia de glicerol a 310 K; a temperaturas de 330K el intercambio es tan rápido que la resonancia de los grupos NH tiende a desplazarse hacia la resonancia del agua haciendo que el intercambio entre ambos grupos no pueda diferenciarse por separado. En definitiva, la dependencia del % TM de la temperatura y el pH parece ser compleja y diferente de la dependencia que exhiben el ADC y el T_1 . Tomados en su conjunto estos resultados sugieren que el % de TM, depende de factores adicionales al ADC o T_1 en los rangos de temperatura y pH investigados.

4.1.5. Imagen de Resonancia Magnética potenciada en T_1 , T_2 , difusión y TM sobre maniqués. Obtención de mapas paramétricos in vitro

Dado que los estudios de correlación anteriores se habían llevado a cabo a 11.7 Teslas y que los experimentos *in vivo* se llevarían a cabo a 7 Teslas, se realizaron experimentos de correlación similares, pero empleando imagen por Resonancia Magnética a este campo. La composición del maniquí, las secuencias de imagen empleadas y el procesamiento requerido para obtener los mapas se han descrito previamente en la sección 3.3.4. y 3.7. La **Figura 35** muestra estos resultados:

Figura 35. Mapas paramétricos de T_1 , T_2 , ADC y %TM (a 7T, 22 °C), en un maniquí con soluciones de glutatión 1M en ausencia y presencia de diversos agentes viscosizantes. Mapas de color de T_1 (A,E), T_2 (B,F), ADC (C,G) y % TM (D). 1: 0% Glicerol; 2: 15% Glicerol; 3: 33% Glicerol; 4: Agua; 5: 5% Dextrano; 6: 3.7% Gelatina porcina.

Dado que los valores de T_1 , T_2 y ADC del agua son más elevados que en el resto de las disoluciones es necesario emplear dos escalas de color diferentes para representar el rango completo de variación. Así los paneles A, B y C corresponden a los valores del agua en una escala superior a la de los paneles D-G que muestran los valores en una escala inferior para las soluciones de glutatión.



Concretamente, los paneles D y G muestran diferencias significativas entre los pocillos 1-3. Al aumentar la concentración de glicerol (0 al 33% glicerol) el ADC del agua disminuye apreciablemente y también disminuye los valores de T_1 y la transferencia de magnetización entre los protones de agua libre y los protones de los grupos NH del glutatión. La **Figura 36** representa la variación de ADC, T_1 y %TM entre ellos, del mismo modo que los mostrados en los experimentos de alta resolución a 11.7 Teslas (sección 4.1.4). Los tres parámetros disminuyen su valor a medida que aumenta la concentración de glicerol. Este hecho confirma una correlación positiva entre ADC, T_1 y % TM *in vitro* a un campo de 7 Teslas.

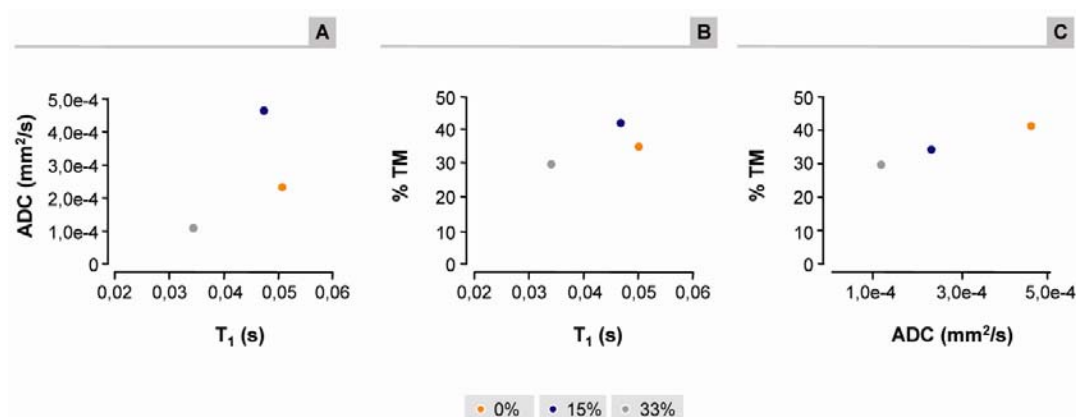


Figura 36. Variación a 7T de T_1 , ADC y %TM de soluciones de glutathione 1M y concentraciones crecientes de Glicerol. Los valores fueron obtenidos tras seleccionar una ROI en cada uno de los pocillos.

En un segundo experimento, se adquirieron imágenes eco de espín incluyendo un pesaje de Transferencia de Magnetización. Concretamente, investigamos la variación de la intensidad de la señal al aplicar 50 y 100 pulsos de presaturación de 10 ms a distintas frecuencias, obteniendo así el espectro z correspondiente a cada disolución. La **Figura 37** muestra los mapas de porcentaje de TM aplicando una presaturación de 50 pulsos en el intervalo de frecuencias $-6000 \text{ Hz} < \nu < 6000 \text{ Hz}$, manteniendo el resto de los parámetros del módulo de TM con los mismos valores del primer experimento. Se aplicó la presaturación en este intervalo de frecuencias para observar los cambios en el mapa de %TM a frecuencias alejadas del glutathione (990 Hz con respecto al agua) y del agua.

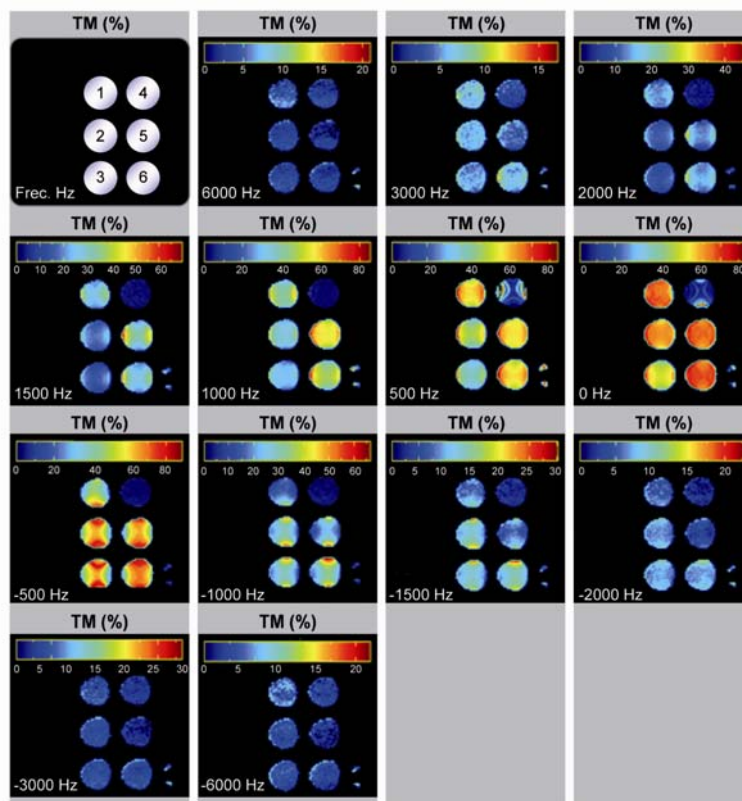


Figura 37. Mapas paramétricos del %TM obtenidos a distintas frecuencias de presaturación. El contenido de los pocillos del maniquí es el mismo que en la **Figura 13**. ROI 1-3 (0%, 15%, 33% Glicerol v/v), ROI 4: H₂O, Roi 5-6: Glutation 1M con 5% Dextrano, 3.7% Gelatina porcina, respectivamente. Los mapas de TM fueron obtenidos por la aplicación de 50 pulsos de presaturación a distintas frecuencias.

La **Figura 37**, muestra que no se produce transferencia de magnetización al aplicar la presaturación entre 6000, 3000 Hz y que, sin embargo, el %TM aumenta entre los grupos NH y el agua al aplicar el pulso a frecuencias cercanas (1500-1000 Hz). Entre 500 y 0 Hz se produce la saturación directa del agua.

La representación gráfica del espectro z correspondiente a cada disolución se hizo seleccionando una Región de Interés (ROI) en el centro de cada pocillo, representando la intensidad media con respecto al offset del pulso de presaturación. Los espectros z obtenidos en este caso aparecen invertidos con respecto a los espectros z mostrados anteriormente, la **Figura 38** muestra los valores del %TM medio en función de la frecuencia de presaturación en cada pocillo. Como puede observarse, la aplicación del doble de pulsos de presaturación no modificó la forma del espectro z ni los porcentajes de transferencia de magnetización, indicando que 50 pulsos son suficientes para inducir una Transferencia de Magnetización máxima.

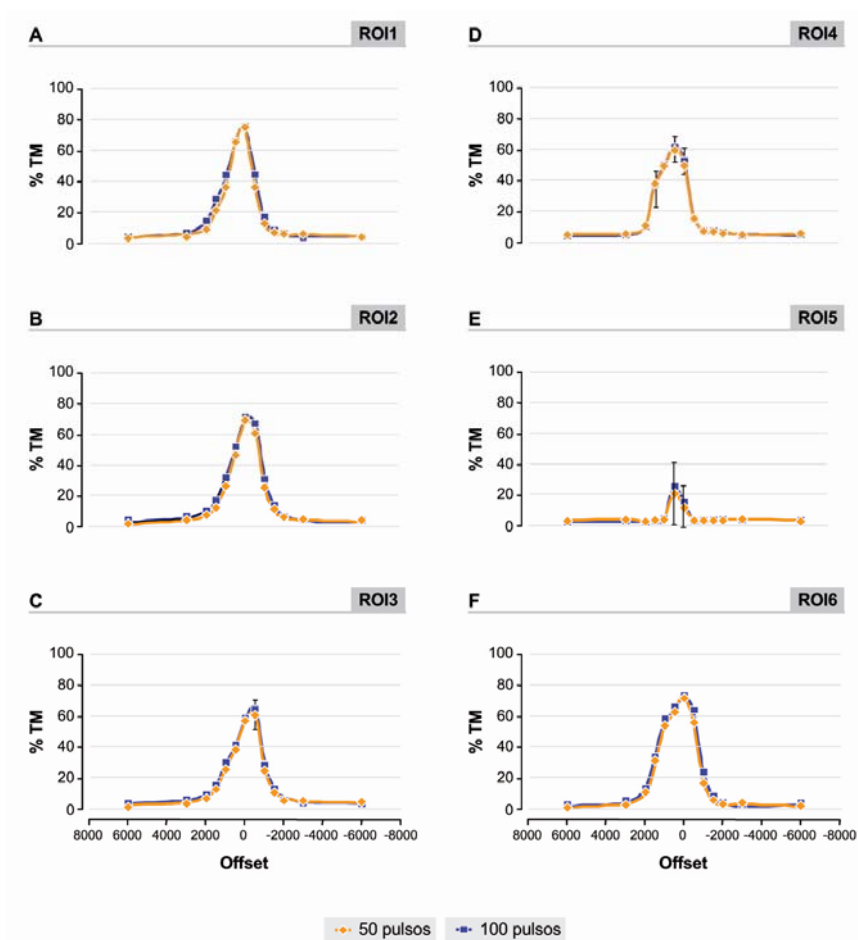


Figura 38. Espectros z a 7T de cada una de las disoluciones que componen el maniquí. Los espectros z se obtuvieron a 7T y corresponden a los pocillos del maniquí de la **Figura 13**. La saturación fue aplicada desde $-6000 \text{ Hz} < \nu < 6000 \text{ Hz}$. El contenido de cada pocillo es el indicado en las figuras anteriores.

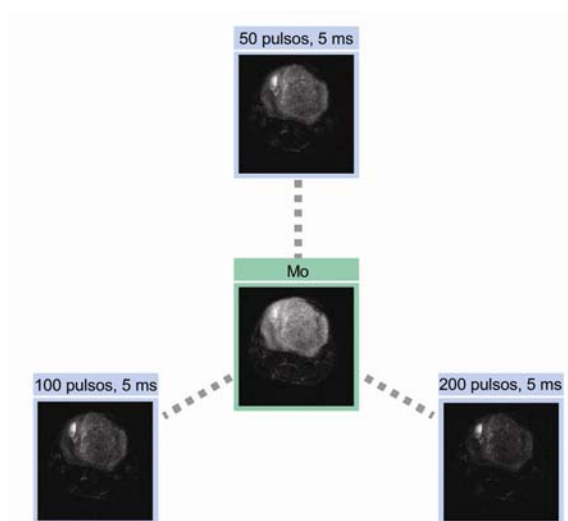
En la **Figura 38**, cada ROI de la **Figura 37** viene representado en un espectro z independiente. Las resonancias de los grupos NH del glutation aparecen a aproximadamente a 900 Hz del agua. Al aplicar la presaturación a esta frecuencia en todos los casos (excepto el espectro z de ROI 5 cuyo contenido es agua) aparece un codo que revela la transferencia de magnetización de los grupos NH con el agua. Estos experimentos demuestran, mediante imagen RM en este caso, los procesos de intercambio químico entre el péptido modelo y el agua a 7 Teslas. La **Figura 35** muestra una vez más, que la microviscosidad del medio condiciona significativamente los procesos de intercambio químico, de manera que la transferencia de magnetización se ve dificultada en los microentornos más viscosos con ADC del agua reducido.

4.2. Experimentos de Transferencia de Magnetización *in vivo*

4.2.1. Optimización de la secuencia

La **Figura 39** muestra un ejemplo representativo de las imágenes obtenidas durante la optimización de la secuencia con Transferencia de Magnetización. El número de pulsos se fue variando y la duración de cada uno de ellos se mantuvo constante. M_0 representa la imagen sin aplicar presaturación y M_s representan las imágenes correspondientes tras aplicar la presaturación a 1500 Hz del agua.

Figura 39. Optimización de los parámetros de la secuencia con Transferencia de Magnetización *in vivo*. En cada imagen se modificó el número de pulsos ($n= 50, 100$ y 200) y la duración de cada uno de ellos se mantuvo a 5ms. La potencia del pulso fue de $5.5 \mu T$. La frecuencia de saturación se aplicó a 1500 Hz.



La **Figura 40** muestra las gráficas del %TM correspondientes a cada una de las diferentes regiones cerebrales en función del número de pulsos y de la duración de cada uno de ellos. En la optimización del módulo de TM se busca obtener la máxima transferencia posible sin que haya saturación directa de la señal de agua. Por ello una de las regiones seleccionadas es el ventrículo que, por estar compuesto por líquido cefalorraquídeo, representa una buena aproximación al “pool” de agua libre y por tanto puede ser utilizado como control de saturación directa de la señal de agua.

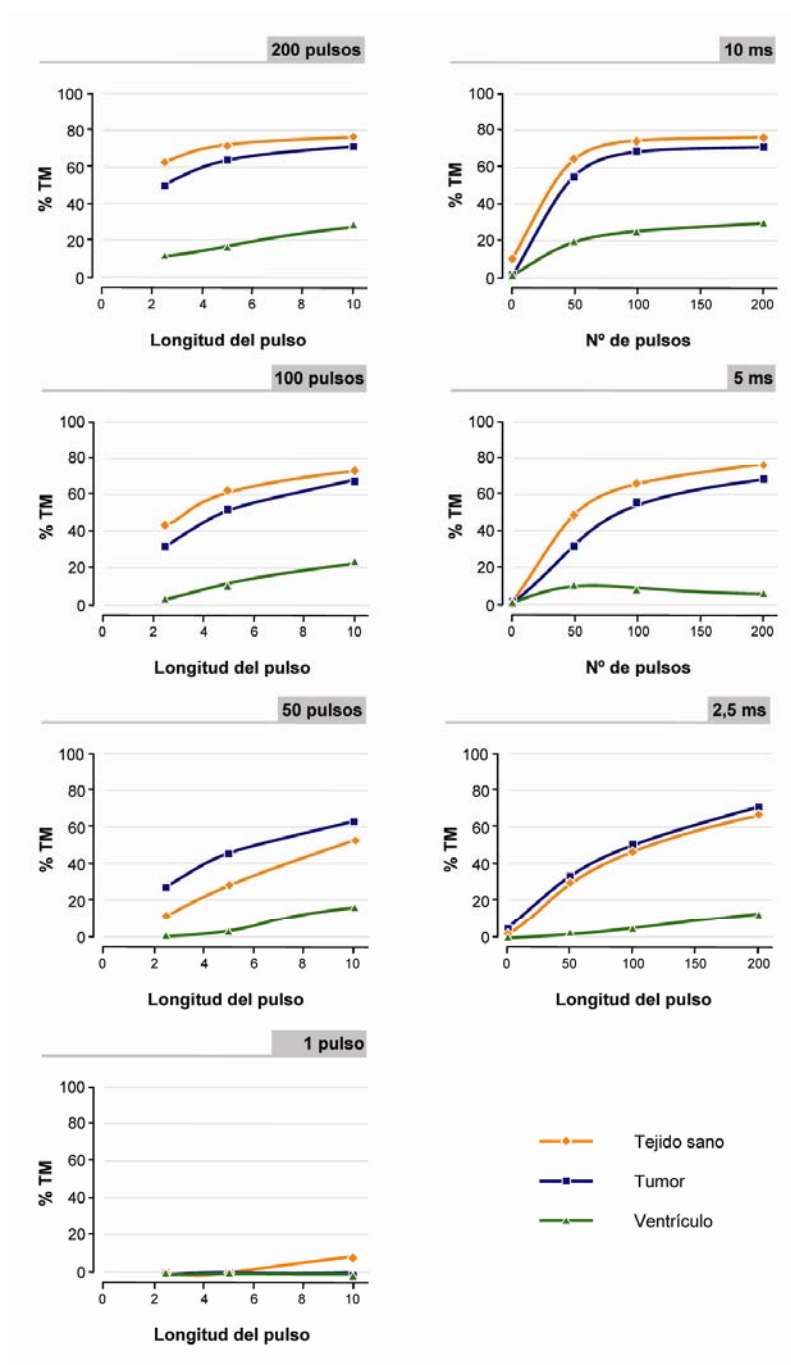


Figura 40. Optimización del módulo de TM. La elección del tren de pulsos (número y longitud de cada uno) será aquel que produzca la saturación de la señal en el tejido sano (línea naranja) y tumoral (línea azul) con respecto a la señal cero de %TM en el ventrículo (línea verde) ya que el contenido de ésta es agua.

Al aplicar una saturación de 10 ms. ambos tejidos, el tumoral y el sano muestran una cinética de saturación similar que puede conducir a error en los estudios multiparámetros posteriores. Las mejores condiciones de adquisición serán aquellas que

permitan distinguir entre las tres regiones seleccionadas. De esta manera, al aplicar un pulso con 5ms de duración y un tren de 50 pulsos, la diferencia de %TM es lo suficientemente grande entre las tres regiones para diferenciarlas cuantitativamente. El tiempo entre pulsos fue de 0.3 ms según la bibliografía (Lemaire *et al.*, 2000), la potencia fue de 5.5 μ T ya que en experimentos previos se comprobó que con esta potencia se producía una saturación óptima de la señal sin producir un sobrecalentamiento del animal.

4.2.1.1. Mapas paramétricos *in vivo*

La **Figura 41** muestra un ejemplo representativo de los cuatro mapas paramétricos calculados en diferentes animales (mapas de T_1 , T_2 , ADC y %TM, respectivamente). En esta figura, se puede observar como las diferencias entre las diferentes zonas son más notables en los mapas de T_2 y de ADC. Por este motivo las ROI's fueron seleccionadas en estos mapas. Los valores de T_1 y de T_2 siguen un patrón semejante. La zona activa del tumor (anillo periférico) presenta unos valores de T_1 y T_2 inferiores a los alcanzados en las regiones edematosas y necróticas, y superiores con respecto a los valores obtenidos en el tejido sano. Con respecto a los mapas de ADC, en la zona activa o zona proliferativa del tumor, los valores alcanzados son menores que los obtenidos en las zonas necróticas y edematosas. El valor medio está en torno a $0.8 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ en la zona proliferativa frente a valores de entre $1.5 \cdot 10^{-3}$ - $2 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ en la zona edematosa/necrótica. En el tejido sano (región contralateral) los valores del ADC son ligeramente inferiores a los observados en la zona tumoral ($\sim 0.7 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$). Con respecto a los valores obtenidos en los mapas de porcentaje de transferencia de magnetización, se puede distinguir el tejido sano con un porcentaje del 35% de transferencia de magnetización con respecto al tejido enfermo (15-20%). Y dentro del tejido enfermo se observan diferencias entre edema, necrosis y zona proliferativa, siendo los valores de TM mayores en las zonas de edema y necrosis.

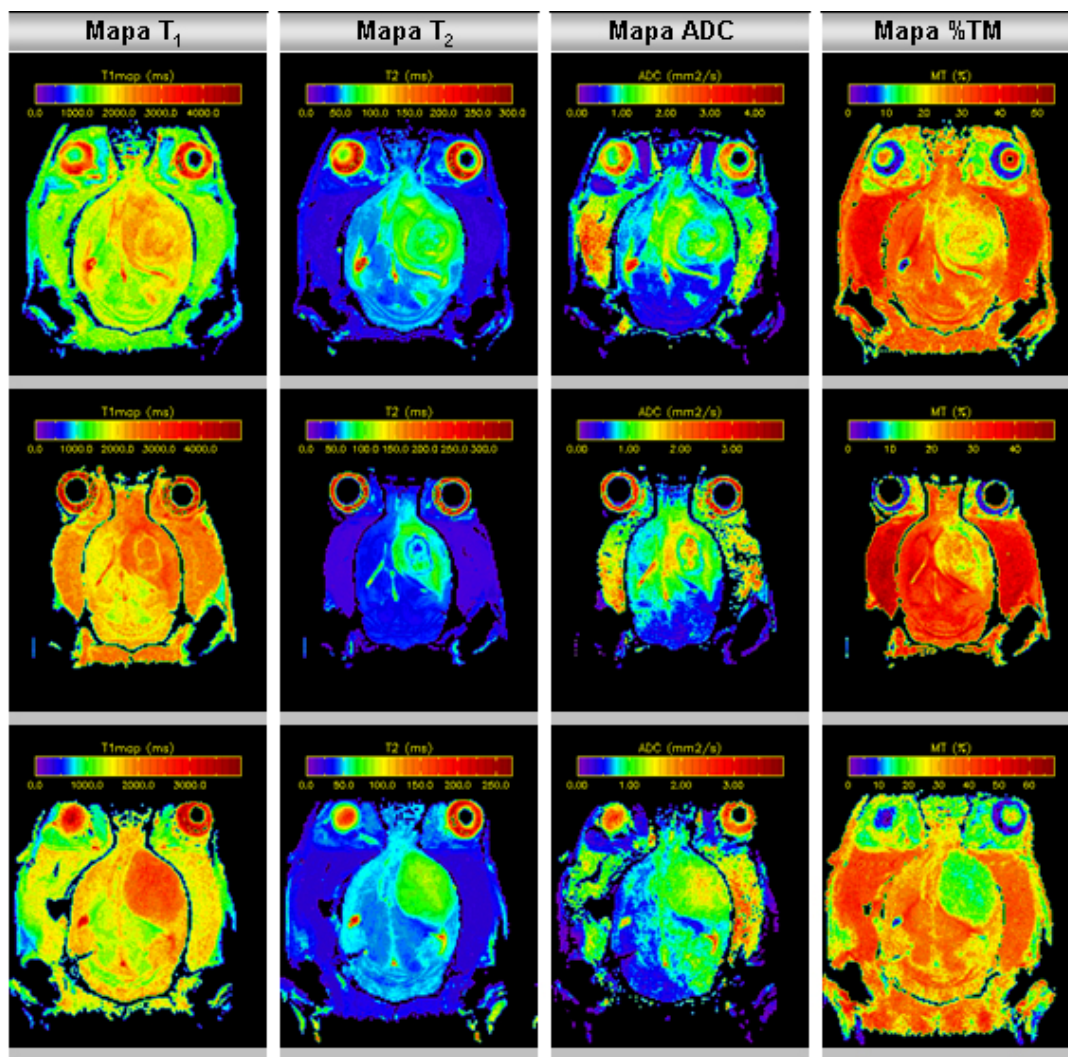


Figura 41. Mapas paramétricos de T_1 , T_2 , ADC y %TM representativos de cerebro de rata portadora de un glioma C6. La primera columna corresponde a los mapas de T_1 . La segunda columna corresponde a los mapas de T_2 , la tercera a los mapas de ADC y la última a los mapas de transferencia de magnetización.

La **Figura 42** muestra la variación de cada uno de los valores medios de T_1 , T_2 , ADC y %TM medidos en las regiones seleccionadas. Los valores medios fueron los obtenidos en los nuevos animales.

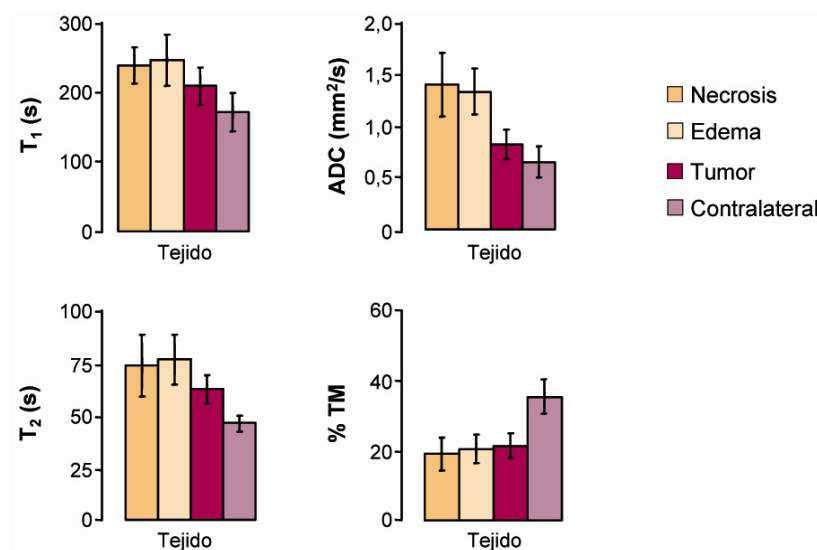


Figura 42. Variación de T₁, ADC, T₂ y %TM en las cuatro regiones seleccionadas (necrosis, edema, tumor y región contralateral). Los valores corresponden a la media de los nueve animales.

4.3. Análisis estadístico discriminante aplicado a la delimitación de los bordes tumorales.

En primer lugar, el análisis permitió determinar si las variables (animal, sección y región) contribuían al estudio. El primer abordaje consistió en un análisis multivariante. En la **Tabla X** se muestra los resultados obtenidos de las pruebas de efecto intrasujetos estudiando la contribución de las variables sección y región como factores de variabilidad en el estudio de los parámetros (ADC, T₂, T₁ y % TM).

Tabla X
Pruebas de efectos intra-sujetos

	ADC		T ₂		T ₁		%TM	
	F	Significación	F	Significación	F	Significación	F	Significación
Sección	3.130 ^a	0.075	0.072	0.931	2.327	0.134	1.111	0.357
Region	54.904	0.000	24.378	0.000	41.205	0.000	90.533	0.000
Sección x región	2.476	0.038	0.585	0.740	2.354	0.048	1.726	0.139

^a esfericidad asumida

En este caso, las pruebas de esfericidad asumida muestran que no existen diferencias significativas según la sección. Por tanto, se pudieron agrupar los valores y considerarlos como una única sección. Sin embargo, como cabría esperar, si existen diferencias significativas entre regiones. El siguiente paso fue realizar el Test de

Bonferroni para comparar y estudiar la diferencia entre medias y su significación entre las cuatro regiones (N: necrosis, T: tumor, E: edema y S: tejido sano contralateral) de cada parámetro

Tabla XI
Comparaciones por pares entre regiones

región	(J)región	ADC	T ₂	T ₁	% TM
		Significación ^a	Significación ^a	Significación ^a	Significación ^a
N	T	0.002	0.105	0.087	0.148
	E	1.000	1.000	1.000	0.725
	S	0.001	0.004	0.001	0.000
T	N	0.002	0.105	0.087	0.148
	E	0.001	0.063	0.116	1.000
	S	0.021	0.000	0.000	0.000
E	N	1.000	1.000	1.000	0.725
	T	0.001	0.063	0.116	1.000
	S	0.000	0.000	0.000	0.000
S	N	0.001	0.004	0.001	0.000
	T	0.021	0.000	0.000	0.000
	E	0.000	0.000	0.000	0.000

^a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.
Significación a nivel de 0.05

La **Figura 43** ilustra las gráficas correspondientes a las medias marginales estimadas en cada parámetro. De esta manera es posible estudiar las diferencias por secciones y por regiones y ver su influencia en el ADC, T₂, T₁ y % TM. Con respecto al panel de la derecha no existen diferencias significativas por secciones (**Tabla X**). En cada una de las regiones, los valores de cada parámetro son similares en las tres secciones tomadas. Sin embargo, en el panel de la izquierda se observa la gran diferencia que existe entre regiones. Esta figura ilustra de manera más visual los resultados expuestos en las tablas anteriores (**Tabla XI**). Más concretamente, muestra que sería posible distinguir con los valores de ADC, la necrosis y el edema con respecto a la zona activa del tumor y la zona de tejido sano pero no entre necrosis y edema. Lo mismo ocurre para el T₂ y el T₁.

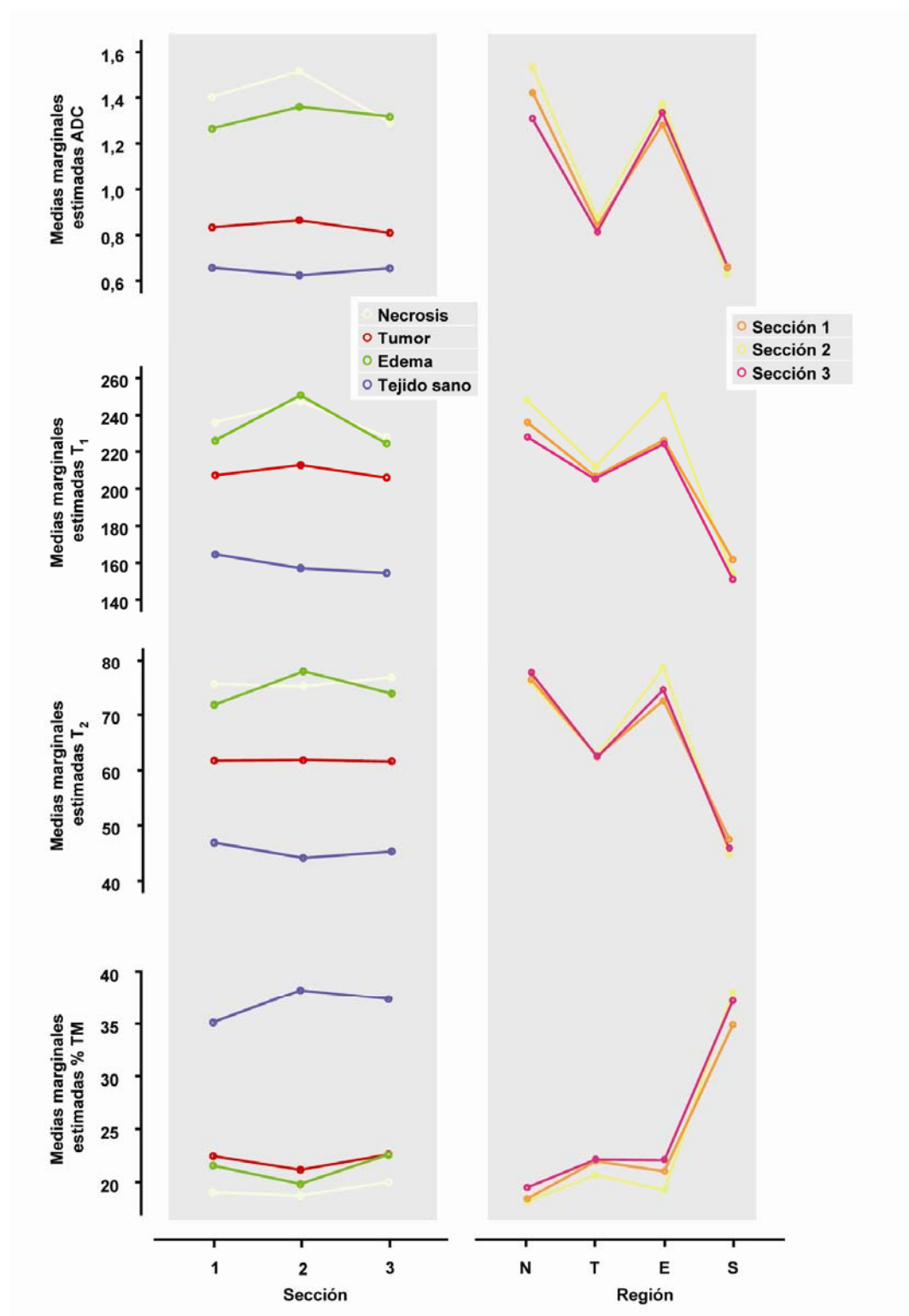


Figura 43. Medias marginales estimadas de ADC, T₁, T₂ y %TM. El panel de la izquierda representa el estudio de la variación de cada parámetro por regiones en cada sección y el panel de la derecha muestra las diferencias por secciones en las cuatro regiones seleccionadas.

A continuación se llevó a cabo los análisis de clasificación de cada parámetro en las cuatro regiones diferenciadas, previamente se realizó en un análisis de inclusión por pasos para determinar cual era el parámetro que aportaba mayor poder discriminante.

De esta manera, se estudió el poder discriminante de ADC, T_2 , T_1 , y %TM. La **Tabla XII** muestra que es el porcentaje de Transferencia de Magnetización el parámetro que aporta mas información ya que en el análisis por pasos, es el único parámetro que entra en el primer paso por tener menor valor en la Lambda de Wilks. En segundo lugar es el ADC en tercer lugar el T_2 y por último el T_1 que entra en el cuarto paso. El análisis demostró que los valores de T_1 apenas aportaban información relevante que pudiese servir como discriminante, por lo que este parámetro no se tuvo en cuenta en los estudios estadísticos posteriores, no mejora el poder discriminante. Lo mismo ocurre con el T_2 , por tanto los dos únicos parámetros que aportan poder discriminante son el ADC y el %TM.

Tabla XII
Poder discriminante de los parámetros en el proceso por pasos

Paso	Parámetro	Tolerancia	Lambda de Wilks
1	%TM	1.000	
2	%TM	0.890	0.298
	ADC	0.890	0.292
3	%TM	0.660	0.235
	ADC	0.753	0.219
	T_2	0.560	0.146
4	%TM	0.645	0.226
	ADC	0.747	0.208
	T_2	0.506	0.138
	T_1	0.719	0.136

A continuación se analizaron los valores obtenidos de las cuatro regiones seleccionadas y se obtuvieron las primeras funciones discriminantes de Fisher. En este análisis, los valores fueron clasificados correctamente con un 74.3% de acierto en la agrupación de los casos originales (**Tabla XIII**). Del total de los casos que fueron agrupados inicialmente como necrosis, el 32.1% se confundió con edema y un 14.5% con tumor, únicamente un 53.5% se delimitó correctamente como necrosis.

Tabla XIII
Resultados de la clasificación (%) en las cuatro regiones seleccionadas

Región Original	Grupo de pertenencia pronosticado				Total
	N	T	E	S	
N	53,5	14,5	32,1	,0	100,0
T	2,9	93,3	2,0	1,8	100,0
E	28,7	9,3	59,3	2,7	100,0
S	,0	7,5	,0	92,5	100,0

^a Clasificados correctamente el 74,3% de los casos agrupados originales. Resultados obtenidos cuando se agrupan todos los valores en una sola sección. Se analizaron las 4 regiones por separado siendo N: necrosis, T: tumor, E: edema y S: tejido sano

La **Figura 44** representa un gráfico de dispersión que muestra la correlación existente entre todos los valores de ADC y el porcentaje de transferencia de magnetización de las cuatro regiones. En este gráfico se observa que los valores de ADC y %TM de la región necrótica (N) y del edema (E) son similares y que no pueden ser distinguidos por este método de selección.

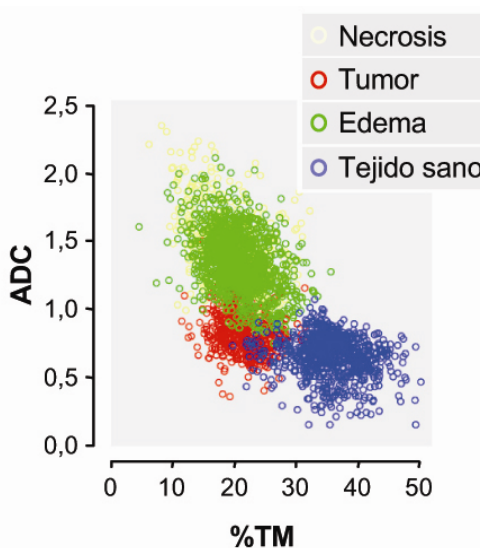


Figura 44. Gráfico de dispersión de los valores de ADC (mm²/s) frente a los valores de %TM en las cuatro regiones seleccionadas. Los valores se representan por colores según la región seleccionada. Los valores obtenidos de la necrosis y del edema son semejantes y no se pueden distinguir con claridad.

Los valores mostrados en la **Tabla XIII** y en la **Figura 44** indican un solapamiento entre los valores de la necrosis y el edema. Debido a esto, en el siguiente estudio se agruparon las regiones N y E (necrosis y edema) obteniendo los resultados mostrados en la **Tabla XIV**. También se vio que el % TM era el que aportaba mayor poder discriminante (datos no mostrados) En este caso, se agruparon correctamente un 89.3% de los casos

originales. La zona tumoral se clasificó correctamente en un 94.1% de acierto, tan sólo el 4.1% de estos valores se agrupó como edema y un 1.8% como tejido sano.

Tabla XIV
Resultados de la clasificación (%) en la agrupación: necrosis y edema

Región Original	Grupo de pertenencia pronosticado			Total
	T	E+N	S	
T	94,1	4,1	1,8	100,0
E+N	12,6	85,8	1,5	100,0
S	7,3	,0	92,7	100,0

^a Clasificados correctamente el 89,3% de los casos agrupados originales. Resultados obtenidos cuando en la región iii se agrupan los valores de edema y necrosis.

Con esta metodología (agrupación de necrosis y edema) y siguiendo el mismo esquema empleado en el estudio anterior, la **Figura 45** muestra un gráfico de dispersión que representa los valores de ADC frente al %TM para las tres regiones

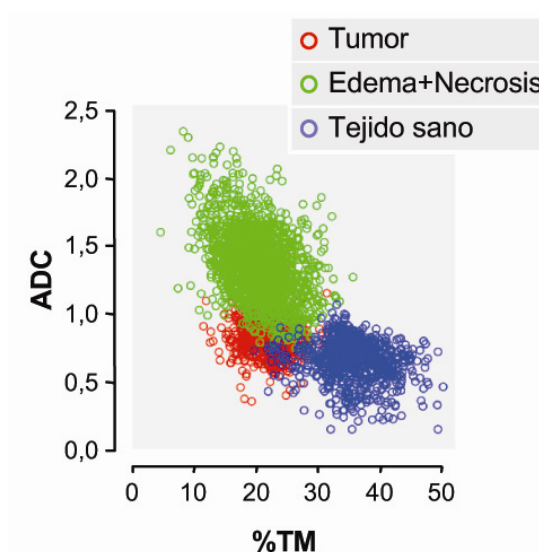


Figura 45. Gráfico de dispersión de los valores de ADC (mm^2/s) frente a los valores de %TM agrupando la necrosis y el edema en una misma región. Los valores se representan por colores según la región seleccionada (T: tumor, E+N: edema + necrosis y S: tejido sano).

Los resultados mostrados hasta ahora corresponden al conjunto de todos los valores obtenidos. Para evaluar la influencia de los valores extremos en el porcentaje de fallo en la clasificación, se llevó a cabo un LDA con las medias de los valores. En este análisis estadístico se tuvieron en cuenta los valores medios del ADC y del %TM en la zona proliferativa tumoral (T), edema (E) y tejido sano o región contralateral (S) sin añadir al

análisis la región de necrosis. Los resultados de la clasificación son mostrados en la **Tabla XV**.

Tabla XV
Resultados de la clasificación(a) (%) de los valores medios de las regiones:
tumor, edema y tejido sano

Sección Original	Grupo de pertenencia pronosticado			Total
	T	E	S	
T	96.3	3.7	.0	100,0
E	3.7	96.3	.0	100,0
S	7.4	.0	92.6	100,0

^a Clasificados correctamente el 95.1% de los casos agrupados originales. En este caso no se considero la necrosis

Este análisis permite clasificar el 95.1% correctamente respecto a los casos originalmente agrupados, solo un 3.7 % fue mal clasificado entre tumor y edema con respecto a la región tumoral. La **Figura 46** representa la dispersión de los valores en las tres regiones delimitadas.

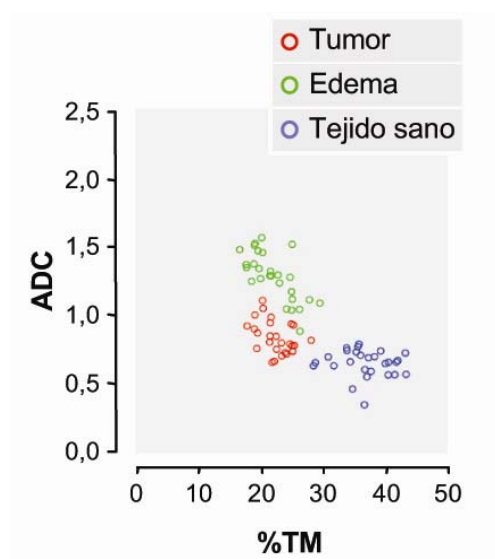


Figura 46. Gráfico de dispersión de ADC (mm²/s) frente a %TM correspondiente a las medias de los valores de tumor, edema y tejido sano. Los valores representan las medias en las tres regiones seleccionadas (T: tumor, E: edema y S: tejido sano).

4.3.1. Funciones de Fisher. Mapas de probabilidad.

El análisis LDA de los datos de cada grupo de pertenencia permitió obtener las funciones de clasificación (o funciones de Fisher); las cuales fueron empleadas para predecir el grupo de pertenencia de los datos sin clasificar y así calcular los mapas de probabilidad. Las funciones de Fisher finales empleadas para los cálculos posteriores son:

$$f_{\text{tumor}} = -30.978 + 1.624 * TM + 29.947 * ADC \quad [18]$$

$$f_{\text{edema}} = -48.010 + 1.763 * TM + 42.870 * ADC \quad [19]$$

$$f_{\text{tej.sano}} = -53.588 + 2.377 * TM + 31.483 * ADC \quad [20]$$

Con estas funciones se calcularon los mapas de probabilidad (P_{tumor} , P_{edema} y $P_{\text{contralateral}}$) (sección 3.8). A partir de estos mapas se generaron dos tipos de imágenes:

- 1) Mapas individuales de probabilidad (a: tumor, b: edema y c: tejido sano o contralateral). En estos mapas se representa la probabilidad de pertenecer a un grupo en escala de grises de 0 a 1, donde 0 corresponde al color negro y 1 al blanco
- 2) Mapas combinados tricolor en los que a cada grupo de pertenencia se le asigna un color y el corte (cut-off) de probabilidad se establece en 0.9.

Estos mapas se muestran en la **Figura 48** junto con el resto de las imágenes obtenidas en el estudio paramétrico. También se muestran los cortes histológicos de los cerebros. Antes de mostrar esta figura es necesario explicar la correlación que se encuentra en las imágenes de RM y los cortes histológicos

4.4. Correlación con los estudios de anatomía patológica

Con el fin de corroborar la correcta asignación de las diferentes regiones (tumor, edema, necrosis, etc.) se llevaron a cabo análisis histológicos de todos los cerebros empleados en el estudio de RM (sección 3.5.4). Para ello se utilizó la tinción con Hematoxilina-Eosina mostrada en la **Figura 47**.

En un principio, este estudio intenta buscar una correlación a nivel macroscópico entre el corte histológico y el corte anatómico obtenido por imagen de Resonancia

Magnetica. Sin embargo, resulta difícil obtener el mismo corte en ambas técnicas. La **Figura 47** muestra cortes histológicos en los que se ve claramente como se puede distinguir entre la zona tumoral y el tejido normal debido a la alta densidad de núcleos teñidos en la primera. Las zonas edematosas y zonas necróticas presentan una menor concentración de núcleos y las zonas necróticas presentan un aspecto cuarteado.

Aunque no es posible establecer una correlación directa (píxel por píxel) entre las imágenes de RM y las secciones histológicas, sí es posible, mediante un análisis visual exhaustivo de los cortes histológicos, confirmar la correcta asignación de las diferentes regiones estudiadas. Así, en las **Figuras 47 y 48** puede verse como efectivamente los tumores C6 generalmente presentan una zona necrótica central, rodeada de una zona periférica altamente proliferativa, y con frecuencia una edematosa peritumoral. Exactamente igual a los resultados obtenidos por imagen de RM.

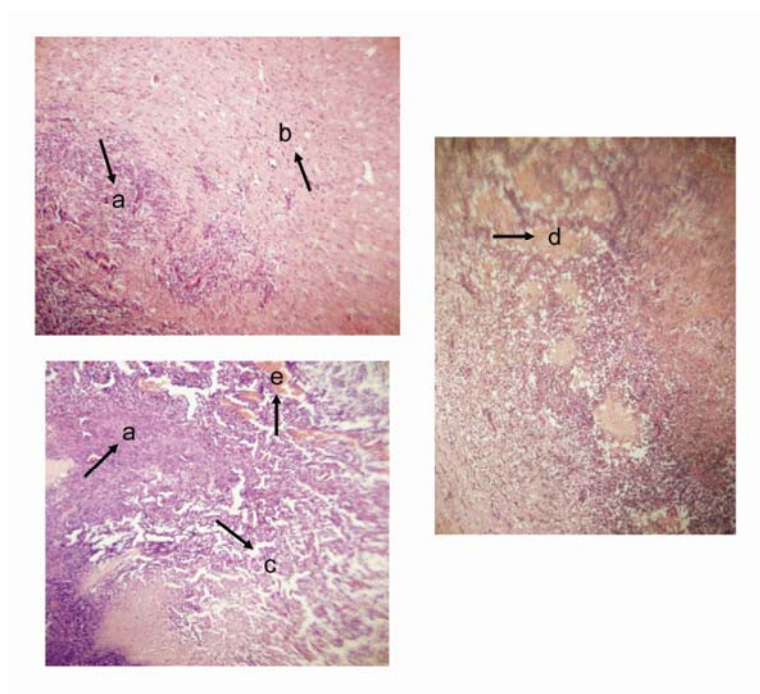


Figura 47. Cortes histológicos de cerebro de rata. Tinción Hematoxilina – Eosina. a) presencia de alta concentración de núcleos teñidos que corresponde a la zona tumoral b) tejido sano c) zonas necróticas que presentan aspecto cuarteado d) region edematosa y e) zonas hemorrágicas

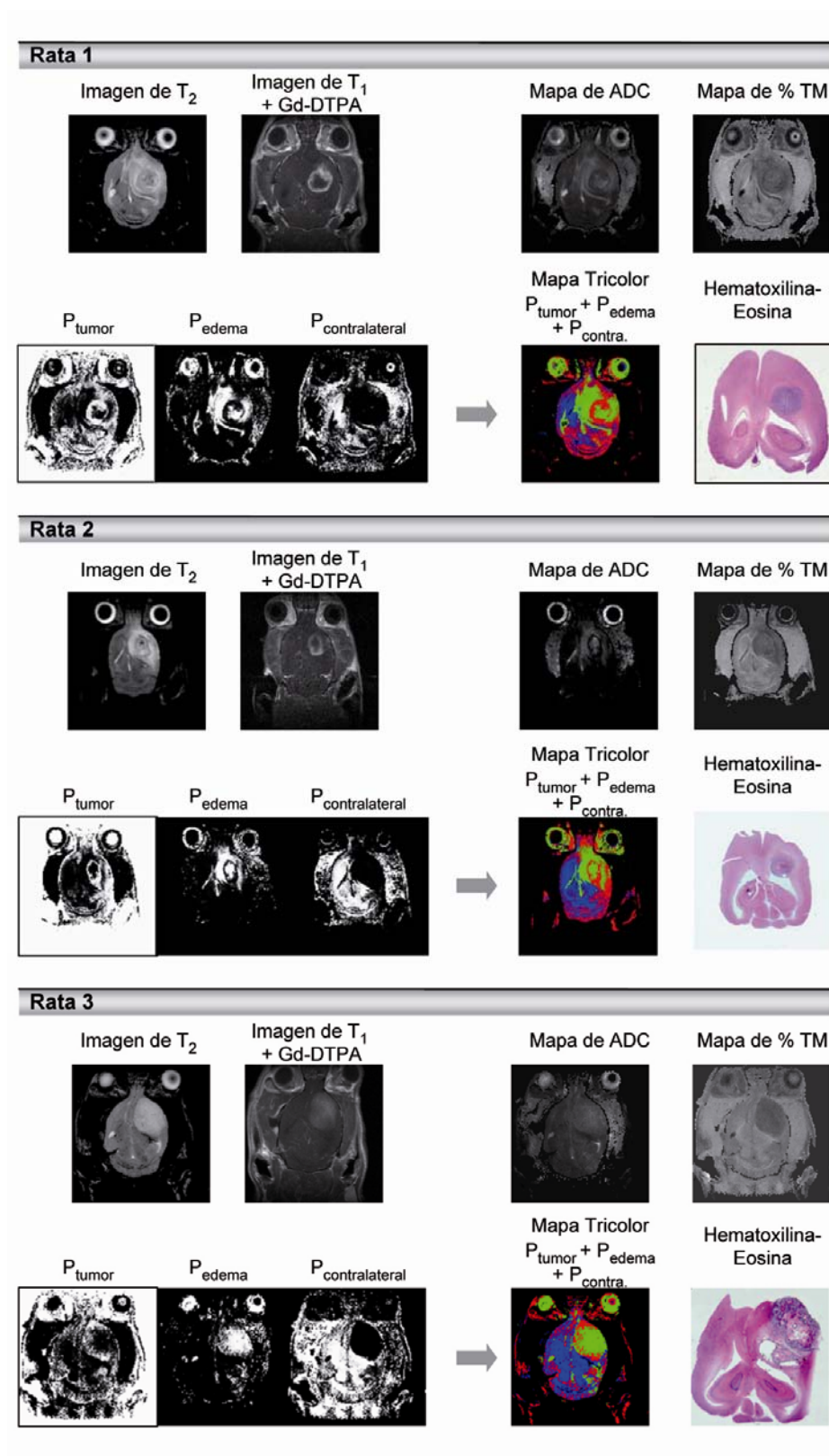


Figura 48. Estudio paramétrico. Análisis Lineal Discriminante. Obtención de los mapas de probabilidad. Tinción Hematoxilina-Eosina.

5. Discusión

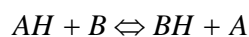
Este trabajo ha estudiado los mecanismos moleculares y fisiopatológicos de los procesos de Transferencia de Magnetización en espectroscopía y en imagen por Resonancia Magnética. En la primera parte del estudio, se ha empleado el glutatión oxidado como sistema modelo para estudiar las bases moleculares y termodinámicas del intercambio de magnetización entre los protones de los grupos NH y el agua. La segunda parte ha investigado los fundamentos del contraste por Transferencia de Magnetización *in vivo* y su relación con otros tipos de contraste, desarrollando un nuevo procedimiento de imagen multiparamétrica para la delimitación de los bordes tumorales en imágenes RM.

5.1 Intercambio químico y su relación con el pH

Antes de discutir los resultados obtenidos resulta conveniente resumir algunos aspectos de la teoría de los intercambios químicos y su relación con la temperatura y pH. En RM de proteínas el principal área de interés para estudiar la dinámica y estructura molecular son los estudios llevados a cabo con los protones lábiles que forman parte de la estructura proteica (Wüthrich, 1986). Estos protones juegan un papel muy importante a la hora de investigar las velocidades intrínsecas de intercambio con el solvente. Según el formalismo de Eigen, el intercambio de los protones lábiles siempre está catalizado por ácidos y por bases (Eigen, 1964). En las soluciones acuosas los grupos OH⁻ y H₂O pueden actuar como catalizadores básicos y los grupos H₃O⁺ y H₂O como ácidos. La constante de transferencia de protón (k_p) se define como:

$$k_p = k_D \frac{10^{\Delta pK}}{10^{\Delta pK} + 1} \quad [21]$$

siendo k_D ($\approx 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25°C) la constante de velocidad de formación del complejo intermedio controlada por la difusión (Wüthrich and Wagner, 1979; Wüthrich, 1986). El segundo término, describe la fracción del complejo formado, ΔpK es la diferencia entre las constantes de acidez del protón donador con el protón aceptor en el complejo. En general, las reacciones de transferencia de protón pueden describirse según la ecuación general (Eigen, 1964).



El mecanismo de esta reacción transcurre a través de la formación de un complejo activado $AH \cdots B$, como sigue:



Con respecto al pH es posible demostrar que

$$\text{Log}K_{eq} = pK_b - pK_a \quad [22]$$

Donde pK_a y pK_b indican los pK_a 's de AH y BH respectivamente. Así, la transferencia de protón desde AH a B y viceversa resulta mas favorable cuanto mayor sea la diferencia de pK_a 's entre los sitios de intercambio. Cuando uno de sus componentes en intercambio es el agua, la reacción adquiere el carácter de pseudo primer orden y se cumple,

$$AH + H_2O \leftrightarrow AH \cdots H_2O \leftrightarrow A: + H_3O^+$$

$$\text{Ln}K_{eq} = 7 - pK_a = \text{Ln} \frac{k_1}{k_{-1}} \quad [23]$$

O bien

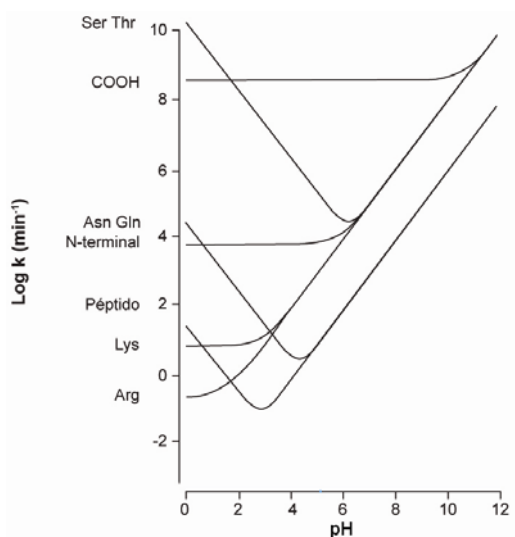
$$k_1 = k_{-1} \cdot 10^{7-pK_a} \quad [24]$$

Finalmente, se puede deducir también una relación entre las constantes de velocidad de transferencia de protón y el pH. En la ecuación:

$$\text{Log} \frac{k_1}{k_{-1}} = pH + \log \frac{[A]}{[AH]} \quad [25]$$

De manera que la constante de velocidad aumenta con el pH, como corresponde a un proceso catalizado por base. Es frecuente encontrar en la literatura diversos trabajos que demuestran y estudian los intercambios de protón entre dos o más especies. En uno de los trabajos descritos por Bai se explica como es posible determinar estas velocidades de intercambio, sustituyendo los protones intercambiables por átomos de deuterio en cadenas de aminoácidos de poca longitud (Bai *et al.*, 1993). En otros trabajos, como en el de Eigen estos intercambios son estudiados en péptidos de mayor tamaño molecular (Eigen, 1964). En general, estos intercambios son estudiados representando logaritmicamente las constantes de velocidad de intercambio en función del pH. En la **Figura 49** se muestra un ejemplo representativo de este tipo de gráficos, en los que se estudia el intercambio de varios aminoácidos con el solvente (en este caso, agua) en función del pH. Un aspecto que hay que añadir a este tema es que el intercambio va a estar además influenciado por el entorno, influyendo así, la disposición y el tipo de aminoácidos a ambos lados del grupo que se está estudiando (Bai *et al.*, 1993).

Figura 49. Representación logarítmica de las constantes de velocidad de intercambio (k , min^{-1}) de los protones lábiles intercambiables que componen las cadenas polipeptídicas en función del pH



5.2. Experimentos de alta Resolución

5.2.1. Influencia del estado de ionización de los grupos intercambiables

En nuestro trabajo, hemos observado a través de los espectros z , la existencia de intercambios de magnetización entre los grupos NH del glutatión con las moléculas de agua. Estos intercambios están favorecidos por un aumento de pH y de temperatura tal y como demostraron Ward y Zhou en sendos trabajos (Ward and Balaban, 2000; Zhou and van Zijl, 2006) y parecen estar influenciados tanto por el entorno como por el grupo específico NH intercambiable. Esto fue anteriormente demostrado al medir la cinética de intercambio de un protón intercambiable por deuterio en cadenas de péptidos. Fue posible demostrar que los intercambios son específicos de cada aminoácido y que se producen en función del entorno en el que se encuentran, de las condiciones de pH y de la temperatura, además de estar altamente influenciados por la cadena lateral y por la disposición espacial (Bai *et al.*, 1993; Cabrita and Berger, 2002). Los intercambios de magnetización entre ambas poblaciones de protones transcurren a través de mecanismos diferentes y son dependientes del estado de ionización del agua y de los grupos NH del péptido, de sus pK_a 's y del pH de la solución. La **Figura 50** muestra el estado de ionización en el que se encuentra cada uno de los grupos intercambiables del glutatión en función del pH investigado, permitiendo explicar los mecanismos de intercambio en función de la carga del grupo. En la figura, también se muestran los valores de los pK_a 's

determinados experimentalmente y los teóricos, que corresponden a los aminoácidos libres en disolución.

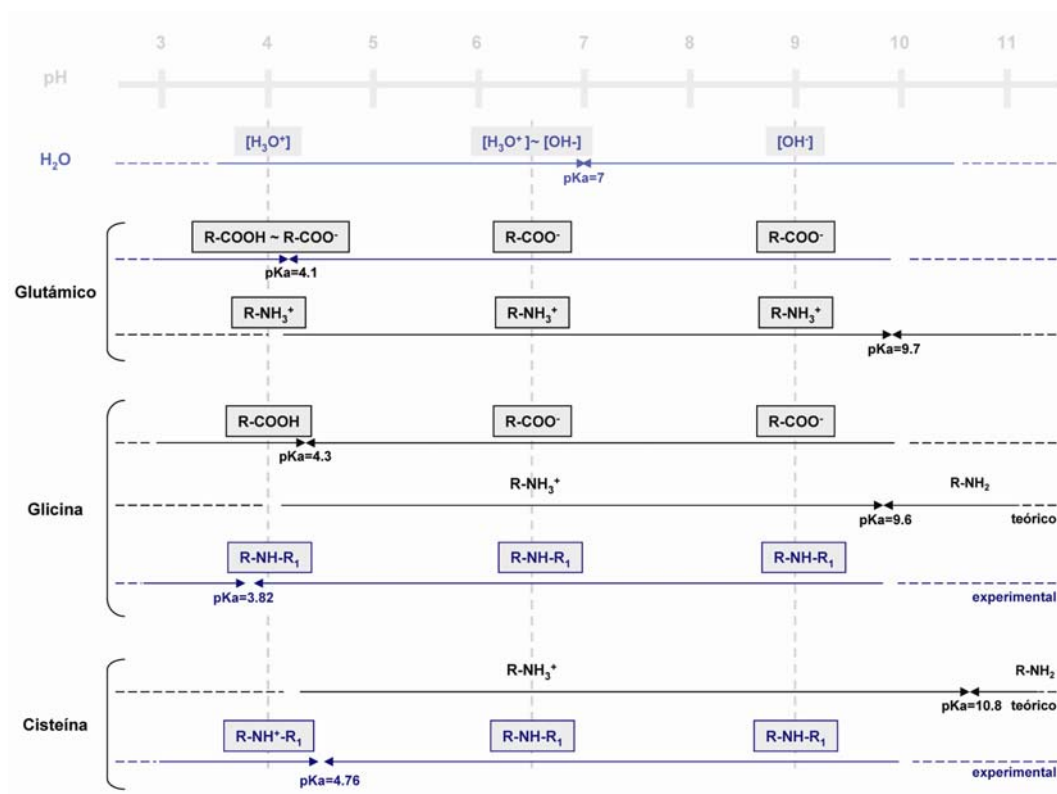


Figura 50. Estados de ionización de los grupos que participan en el intercambio de magnetización en el sistema glutatión-agua en función del pH investigado

Los valores de pK_a de los grupos NH de la glicina y cisteína determinados experimentalmente no coinciden con los teóricos porque se encuentran formando parte del enlace peptídico. En las condiciones investigadas, ambos grupos NH de la glicina y cisteína presentan un pK_a ligeramente ácido, (3.82 y 4.73, respectivamente). Así, en los pH's investigados en este estudio estos grupos no estarán protonados en este rango. Un comportamiento opuesto es el observado en el grupo NH₂, su intercambio con el agua es tan rápido que la determinación de su pK_a es imposible. Si se tiene en cuenta el valor teórico de su pK_a este grupo permanecerá cargado positivamente en todo el rango de pH. Los valores de pK_a de los dos grupos -COOH son alrededor de 2.2 y 2.3 por lo que estos grupos se mantienen cargados negativamente. De esta manera, el estado de ionización global está determinado por el grupo α-COOH del glutámico, el α-COOH de la glicina, por el α-NH₂ del glutámico y los estados de las moléculas de agua en forma protonada (H₃O⁺) y desprotonada (OH⁻).

Como ya se comentó en el apartado de introducción, la TM por CEST, (en nuestro caso: el glutatión), ocurre principalmente por un intercambio químico entre los grupos NH del glutatión y el agua (Zhou and van Zijl, 2006). El único grupo intercambiable del glutatión que permanece protonado durante el experimento es el grupo NH_2 del glutámico, es posible que este grupo intercambie su magnetización con el agua a través de interacciones dipolo-dipolo. Además este intercambio aumenta de velocidad a medida que aumenta el pH; al ser tan rápido, la resonancia de este grupo desaparece bajo la del agua observándose una única señal (Bain, 2003; Zhou and van Zijl, 2006). Sin embargo, los otros grupos NH de la cisteína y glicina intercambian magnetización con los protones del agua a través de un intercambio químico más lento, por lo que se pueden observar sus señales un rango superior. Este mecanismo está influido por los cambios en el estado de ionización de las moléculas de agua en el rango de pH investigado. En general, nuestros resultados indican que los intercambios están dominados por el pK_a del agua. Esta observación resulta razonable, dado que la concentración del agua excede enormemente a la del glutatión y es concebible que sus propiedades dominen el intercambio de magnetización entre ambas especies. La **Figura 51** representa un modelo de los mecanismos que son propuestos en esta tesis, teniendo en cuenta que la difusión influye de manera determinante en la efectividad del proceso de Transferencia de Magnetización.

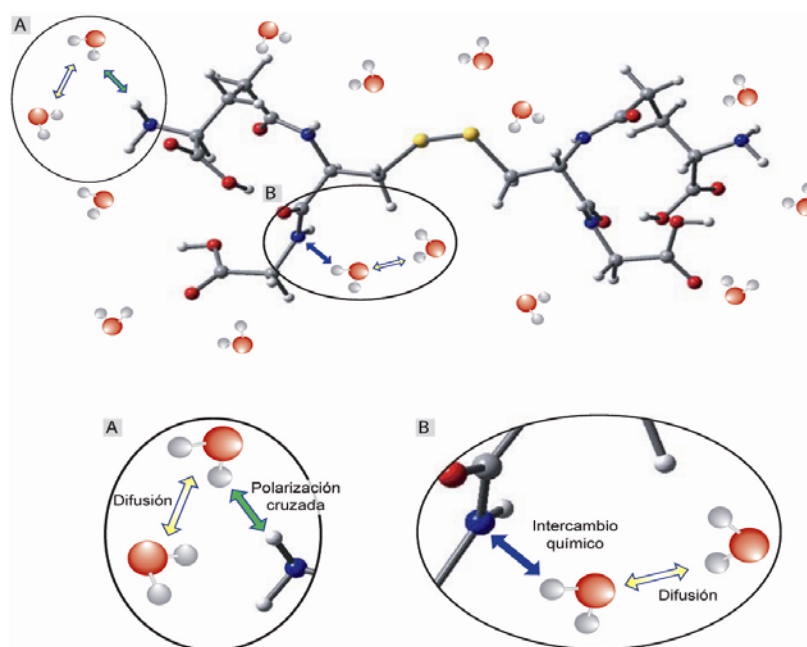
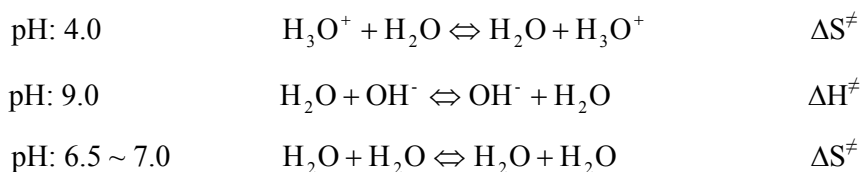


Figura 51. Mecanismos implicados en la Transferencia de Magnetización del glutatión oxidado con las moléculas de agua circundantes.

5.2.2. Mecanismos de la Transferencia de Magnetización y su dependencia con el pH. Estudio de la termodinámica en la Transferencia de Magnetización

A nivel termodinámico, la dependencia del pH y de la temperatura en los procesos de Transferencia de Magnetización se investigó a través de la forma y la anchura de los dos picos de intercambio en los espectros z. En todos los pH's investigados, se ha observado un aumento de la anchura del pico z de intercambio $\text{H}_2\text{O}_{\text{libre}}\text{-H}_2\text{O}_{\text{ligada}}$ al aumentar la temperatura. Sin embargo, el pico de intercambio $\text{NH-H}_2\text{O}$ desaparece al aumentar la temperatura, posiblemente se vea enmascarado por el aumento en los intercambios $\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}$ (aumento de la anchura). La Transferencia de Magnetización entre los grupos NH y el agua en el límite ácido y básico de pH tiende a ser más espontánea al aumentar la temperatura, sin embargo, a pH ligeramente neutro, el comportamiento observado es el opuesto. El cálculo de las variables termodinámicas (ΔH y ΔS) permite definir la termodinámica del proceso en el rango de pH investigado. A pH 4.0 y 9.0, la Transferencia de Magnetización está dirigida entrópicamente (ΔS^\ddagger) mientras que a pH 6.5 está dirigida entálpicamente (ΔH^\ddagger). Si tenemos en cuenta el estado de ionización del agua a cada pH, las reacciones de intercambio entre dos moléculas serían:



En este contexto cabe concluir que las transferencias de magnetización dirigidas entrópicamente son las que involucran un intercambio de carga eléctrica entre moléculas de agua, mientras que las dirigidas entálpicamente no involucran intercambio de carga.

5.2.3. Influencia de la viscosidad en los procesos de Transferencia de Magnetización

La efectividad del intercambio de magnetización entre dos poblaciones de protones está determinada por diversos factores. Hasta ahora se han analizado el pH, la temperatura, el entorno y la diferencia de desplazamiento. Sin embargo, en este trabajo se ha comprobado la existencia de otro factor que incluso puede llegar a ser el factor limitante para el proceso: la microviscosidad del medio o sus variaciones.

Nuestros resultados muestran que la adición de agentes viscosizantes dificulta los intercambios de magnetización entre ambas poblaciones. Estos agentes actúan restringiendo los movimientos de translación y de rotación de las moléculas de agua libre impidiendo así el intercambio de protones desde una población a otra. Los experimentos DOSY y TM muestran que al aumentar la concentración del agente viscosizante se producen disminuciones en la velocidad de intercambio entre las moléculas de agua y los grupos NH del péptido modelo (Cabrita and Berger, 2002; Cabrita *et al.*, 2002). Así, al aumentar las restricciones rotacionales y traslacionales de las moléculas de agua libre en disolución disminuye la probabilidad de efectuar un intercambio de magnetización con los grupos NH del péptido. El aumento progresivo en la concentración de glicerol sobre las disoluciones de glutathione en condiciones fisiológicas (pH 7 y 310K) demuestra la dependencia de la difusión sobre la transferencia de magnetización. Existe una correlación positiva entre los tres parámetros investigados (ADC, T_1 , y %TM). En todos los casos, sus valores disminuyen frente al aumento de concentración del agente viscosizante. También se produce un evento adicional, el aumento en la concentración de glicerol produce un efecto aditivo en el intercambio OH-H₂O frente al intercambio NH-H₂O, por la presencia de los OH del glicerol. Un aspecto importante es como afecta la presencia del agente viscosizante o un incremento de microviscosidad a la dependencia del pH y de la temperatura. En las tres condiciones de pH investigadas, la microviscosidad es la que domina el proceso de intercambio dado que en presencia de un 50% de glicerol los valores de ADC y T_1 disminuyen proporcionalmente. Sin embargo, la falta de linealidad en las variaciones del porcentaje de transferencia de magnetización con el pH sugiere que el mecanismo de intercambio involucra factores adicionales a la microviscosidad.

5.2.4. Mapas de Interacción Molecular

Un requisito necesario para que ocurran los intercambios de magnetización es la disposición óptima de las moléculas de agua del solvente sobre la molécula de glutathione. A través del cálculo de la energía de interacción por química computacional, es la región NH₂ del glutámico la que acomoda más favorablemente las moléculas de agua a su alrededor, seguida de la región NH de la glicina y por último de la región NH de la cisteína. Un resultado importante obtenido en los mapas, es la localización espacial de

los grupos NH de la glicina y cisteína en la estructura tridimensional. Mientras que la glicina se localiza hacia el exterior, el NH de la cisteína se localiza en la cara interna de la molécula 3D (**Figura 28**). Este aspecto contribuye a ser uno de los factores que determinan la transferencia de magnetización más favorable en torno a la glicina. Por otro lado, la distribución mas desfavorable de agua alrededor del grupo NH de la cisteína hace que resulte más sensible al aumento en la concentración del agente viscosizante disminuyendo en mayor proporción el intercambio, lo que explica los resultados de la **Figura 29**.

5.3. Correlación entre los experimentos de alta resolución e imagen en soluciones de glutathione

Estos experimentos permiten concluir que la difusión es el principal factor limitante en los procesos de Transferencia de Magnetización tanto en espectroscopía de alta resolución como en los experimentos de imagen, en ambas técnicas se produce una disminución de ADC y de TM al aumentar la concentración del agente viscosizante. Sin embargo, las imágenes con Transferencia de Magnetización en maniqués de glutathione no aportan la misma sensibilidad que aporta los experimentos de alta resolución.

5.3. Experimentos *in vivo*

5.3.1. Glioma C6 como modelo experimental en el estudio del Glioblastoma Multiforme

El Glioblastoma Multiforme (GBM) es el más agresivo de los tumores donde su tratamiento quirúrgico se ve limitado por su alto grado de invasión e infiltración en los tejidos cerebrales circundantes. Este tipo tumoral causa la muerte a la mayoría de los pacientes después de un año del diagnóstico por su resistencia al tratamiento terapéutico. Tienden a ser morfológicamente multiformes y muestran regiones necróticas y hemorrágicas. Las células tumorales presentan una gran diversidad genética, se produce un gran número de delecciones, puntos de amplificación y mutaciones (Holland, 2000).

El modelo tumoral animal de GBM más ampliamente utilizado es el obtenido por la implantación estereotáxica de células C6 en ratas (Grobbs *et al.*, 2002). Durante el crecimiento, los tumores C6 se desarrollan con una morfología muy similar a la que

se produce en el GBM humano (Auer *et al.*, 1981). Este tipo de tumores C6 se han investigado en diferentes cepas de ratas: Wistar, Sprague-Dawley y Long-Evans (Bernstein *et al.*, 1990; Nagano *et al.*, 1993; Chicoine and Silbergeld, 1995; Whittle *et al.*, 1998). Los formados por implantación de esferoides de C6 en ratas Sprague-Dawley y Long-Evans muestran una morfología homogénea y encapsulada, más parecida a tumores que provienen de metástasis de cerebro que los gliomas desarrollados espontáneamente (Farrell *et al.*, 1987; San-Galli *et al.*, 1989). Sin embargo, en las ratas Wistar se desarrollan tumores con características típicas de tumores malignos: pleomorfismo nuclear, índice de mitosis elevado, focos necróticos, invasión del parénquima, y aparición de bordes difusos infiltrantes por donde las células individualmente invaden el tejido cerebral de alrededor (Bernstein *et al.*, 1990; Chicoine and Silbergeld, 1995). En varios trabajos se ha comprobado que estas células crecen preferentemente alrededor de los vasos sanguíneos mostrando así su afinidad por la membrana del endotelio basal (Auer *et al.*, 1981; Nagano *et al.*, 1993). En comparación con otros modelos experimentales de células C6, los tumores desarrollados en ratas Wistar son los que desarrollan características más propias al glioblastoma humano (Grobbs *et al.*, 2002).

5.3.2. Caracterización de bordes tumorales por Imagen de Resonancia Magnética

Se han empleado diferentes técnicas para la delineación o localización de la masa tumoral, entre ellas cabe destacar la Tomografía Axial Computerizada (TAC), la Tomografía por emisión de positrones (Deloire-Grassin *et al.*) y la Resonancia Magnética. Esta última se ha convertido en una de las herramientas más importantes en el diagnóstico de tumores cerebrales no sólo por su gran versatilidad, sino porque además es la única que no emplea radiaciones ionizantes ni trazadores radiactivos (Pauleit *et al.*, 2004). Uno de los grandes problemas con los que se encuentran los neurocirujanos a la hora de extirpar un tumor es la correcta delimitación de los bordes del mismo. Esto es especialmente difícil en aquellos tumores que presentan un fenotipo infiltrante. Esta situación provoca en ocasiones la incompleta resección del tejido tumoral y con ello la aparición de recidivas. Existen numerosos estudios que han intentado mejorar la correcta delimitación de los bordes tumorales empleando técnicas de imagen de RM.

Hasta la fecha se han llevado a cabo numerosos estudios con imagen convencional cuyo objetivo ha sido la caracterización de los tejidos tumorales (Damadian, 1971; Westbrook, 1993). Como ya se comentó en la introducción, entre las técnicas de imagen de RM convencionales, la imagen pesada en T_2 es capaz de diferenciar el tejido tumoral con respecto al tejido sano por la presencia de regiones edematosas que rodean al tumor, sin embargo, el edema no está siempre presente y eso puede dificultar la identificación del tejido tumoral (Eis *et al.*, 1995; Husstedt *et al.*, 2000; Pauleit *et al.*, 2004). Con la inyección dinámica de agentes de contraste de T_1 (Contrast enhanced dynamic) (Choyke *et al.*, 2003) o por susceptibilidad dinámica (Aronen *et al.*, 1994; Donahue *et al.*, 2000) pueden detectarse cambios en la vasculatura del tumor con respecto al tejido cerebral circundante. Esto permite localizar la región tumoral y estimar la permeabilidad vascular, la tortuosidad, el volumen sanguíneo y la velocidad de flujo (Aronen *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000). El problema es que con el tiempo, el agente de contraste tiende a extravasarse a los tejidos de alrededor y puede llevar a error al producirse una sobreestimación del tamaño del tumor (Parizel *et al.*, 1989; Wilmes *et al.*, 1993; Raila *et al.*, 1999). Aunque estos métodos aportan gran información acerca de la fisiopatología tumoral asociada al grado de invasión tumoral, ninguno de ellos individualmente ha alcanzado un gran éxito en la delimitación de los bordes tumorales o no son capaces de visualizar directamente las células que están invadiendo el tejido cerebral (Lang *et al.*, 1998). Por este motivo, se requieren secuencias de imagen más complejas que sirvan para estudiar cuantitativamente a los tejidos tumorales y definir los bordes tumorales con una mayor exactitud.

5.3.2.1 El ADC como parámetro cuantitativo en la caracterización de los tumores cerebrales

La imagen de difusión, en especial la imagen cuantitativa del ADC, ha demostrado ser de gran utilidad en la caracterización tumoral, así como en otras patologías (Herneth *et al.*, 2000; Finelli, 2001). Se ha propuesto incluso como posible biomarcador para clasificar los distintos tipos tumorales según el grado de malignidad, (Eis *et al.*, 1994; Sugahara *et al.*, 1999; Hein *et al.*, 2004). En varios trabajos, la han caracterizado como la técnica de imagen más potente con respecto a las de RM convencional para el estudio de los tumores y la identificación de diferentes regiones (tumor, edema y tejido sano cerebral) (Eis *et al.*, 1994; Tien *et al.*, 1994; Eis *et al.*,

1995; Gupta *et al.*, 1999; Sugahara *et al.*, 1999). Otros estudios añaden que también puede ser una herramienta diagnóstica para la monitorización de la respuesta tumoral temprana (Herneth *et al.*, 2003; Hein *et al.*, 2004). Sin embargo, Bennet considera que la medida del ADC en tejidos muy heterogéneos no es la técnica mas óptima ya que solo proporciona una aproximación de la distribución de las velocidades de difusión en un vóxel (Bennett *et al.*, 2004).

Las variaciones en el ADC de los distintos tejidos o regiones (tumor, necrosis y edema) se deben a cambios en el balance entre el agua intra y extracelular y a cambios en la estructura de los dos compartimentos según la hipótesis de Benveniste (Benveniste *et al.*, 1992). En el año 2002 se realizaron una serie de estudios neuro-oncológicos para evaluar si la celularidad de los gliomas podía determinar el grado de invasión y su relación con los valores del ADC (Lam *et al.*, 2002). Castillo añadió que el valor del ADC no solo ayudaba a demarcar la zona más agresiva del tumor con mayor celularidad sino también a delimitar el tumor del tejido sano y a identificar regiones recurrentes o residuales (Castillo *et al.*, 2001). Para explicar la dependencia de la celularidad del tumor y el valor del ADC, se han llevado a cabo distintos estudios donde se ha encontrado una correlación inversa entre el ADC y la amplitud del pico de Colina en espectroscopía de RM (Gupta *et al.*, 1999). Esto se debe a que las zonas con mayor densidad celular (menor ADC) son aquellas que presentan mayor tasa proliferativa, y por tanto mayor “turnover” de membranas, que va asociado a un aumento del pico de colina total (Castillo *et al.*, 2001).

El valor del ADC en los tejidos biológicos viene determinado por varios factores, entre los cuales cabe destacar la restricción en el movimiento de los protones del agua por las barreras que encuentran en su camino. Las moléculas de agua tienen que difundir entre las membranas, los orgánulos, entre el citoesqueleto y entre las macromoléculas que existen en el interior de los diferentes compartimentos de los tejidos. También varía en función del tamaño y número de protones móviles en estos compartimentos. El bajo valor del ADC en el tumor se explica como el resultado de una disminución del volumen del espacio extracelular debido a una invasión de las células tumorales y un incremento de la viscosidad intracelular que restringe el movimiento del agua. Algunos autores, en particular Tien (Tien *et al.*, 1994), han propuesto el empleo de los mapas de ADC para estudiar los gliomas malignos y demostrar así que pueden detectarse los límites entre áreas de tejido tumoral (ADC bajo por alta celularidad) y las

áreas peritumorales (ADC alto por presencia de edema vasogénico). Sin embargo, otros autores no están de acuerdo y afirman que no se pueden delimitar las regiones tumorales solamente teniendo en cuenta la información obtenida con los mapas de ADC (Castillo *et al.*, 2001; Stadnik *et al.*, 2001). Los valores encontrados en la bibliografía son similares y en ellos se muestran diferencias significativas entre distintas regiones y tipos tumorales. La **Tabla XVI** resume algunos de estos trabajos:

Tabla XVI
Valores de ADC encontrados en clínica

	ADC ($10^{-3} \times \text{mm}^2/\text{s.}$)		
Gliomas	Tumor	Edema periférico	Sustancia blanca
(Oh <i>et al.</i> , 2005)	1.28 ± 0.21	1.57 ± 0.30	0.81 ± 0.04
(Castillo <i>et al.</i> , 2001; Stadnik <i>et al.</i> , 2001)	1.23 ± 0.45	1.29 ± 0.45	0.78 ± 0.05
(Pauleit <i>et al.</i> , 2004)	1.11 ± 0.30	1.23 ± 0.21	0.85 ± 0.11
Meningiomas/metástasis			
(Oh <i>et al.</i> , 2005)	1.10 ± 0.20	1.47 ± 0.13	0.80 ± 0.12

Generalmente, los GBM presentan los valores más bajos de ADC, los astrocitomas anaplásicos valores intermedios y los astrocitomas de bajo grado son los que muestran mayores valores en el ADC (Castillo *et al.*, 2001).

Aunque existe cierta controversia entre los distintos autores, la información suministrada por el ADC ayuda en una primera aproximación a diferenciar la región altamente proliferativa de la región necrótica y edematosa. Sin embargo, la alta infiltración de estos tumores, la morfología difusa y el metabolismo alterado de las células tumorales dificulta la correcta delimitación con tan solo el valor del ADC. Se requieren técnicas adicionales que permitan el diagnóstico y la correcta delimitación de estos tipos de tumores.

5.3.2.2. Transferencia de Magnetización como herramienta diagnóstica adicional

La Transferencia de magnetización es una de las técnicas más empleadas en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, y la Esclerosis Múltiple principalmente (Hanyu *et al.*, 2001; van der Flier *et al.*, 2002; Horsfield, 2005). Estas patologías cursan con una disminución del contenido de mielina, lo que

conlleva una disminución del “pool” de agua ligada y por tanto, un descenso del porcentaje de TM (Mehta *et al.*, 1996). Recientemente se han descrito estudios en tumores demostrando la eficacia de la TM para diferenciar el tejido tumoral del tejido sano (Lundbom, 1992; Quesson *et al.*, 1997). En estos trabajos se observó que en el tejido enfermo se producía una disminución del porcentaje de transferencia de magnetización comparado con el tejido sano. Algunos estudios han intentado no sólo diferenciar entre tejido sano y tumoral, sino además entre diferentes grados tumorales. Sin embargo, los resultados no han sido concluyentes a este respecto (Lundbom, 1992; Prager *et al.*, 1994; Pui, 2000).

Además de la imagen de la TM clásica, existen recientes alternativas que se basan en la transferencia de magnetización desde grupos específicos de determinadas moléculas, en lugar del intercambio entre agua libre y ligada. Un ejemplo de ello es la denominada APT (Amide Proton Transfer). Esta técnica es capaz de detectar e incluso medir el pH de los tejidos a partir de la transferencia de magnetización entre los protones amida que resuenan a 8.3 ppm y los protones móviles del agua (Mori *et al.*, 1998). Además esta técnica ha sido aplicada recientemente en tumores 9L implantados en rata con el objetivo de evaluar su capacidad discriminante entre tejido tumoral y sano, en comparación con otras técnicas convencionales. Los autores concluyen que la imagen por APT es capaz de delinear el tumor de manera más específica que otras técnicas de imagen, como la difusión o imágenes ponderadas en T₂ (Zhou *et al.*, 2003). Sin embargo, la APT es una técnica de difícil implementación como técnica rutinaria en un entorno clínico ya que, por un lado requiere ajustes muy finos por presentar una alta sensibilidad a las inhomogeneidades de campo, y por otro lado es necesario un procesamiento complejo de imagen para obtener el mapa paramétrico.

En resumen, aunque el uso individual de la imagen de la transferencia de magnetización convencional resulta de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la Esclerosis Múltiple, su aplicación en el diagnóstico tumoral no ha tenido el mismo éxito. Esto probablemente sea debido a la alta heterogeneidad del tejido tumoral que hace más complicada la interpretación de los resultados. Por ello en la mayoría de los casos en los que se aplica al diagnóstico de tumores, la TM sólo se utiliza como técnica complementaria a otras modalidades, como la imagen de difusión. Sin embargo, hasta el momento no hay ningún estudio que

analice en profundidad y de manera cuantitativa el papel de esta técnica en la delineación de los bordes tumorales.

5.3.3. Imagen multiparamétrica. Importancia de la delineación de los bordes tumorales

Han sido muchos los estudios que han tratado de delimitar los bordes tumorales empleando secuencias de IRM convencionales a través del contraste generado en T_2 y en T_1 con inyección de contraste, empleando imagen de difusión (Eis *et al.*, 1994; Tien *et al.*, 1994; Eis *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1999; Sugahara *et al.*, 1999), e incluso imagen de transferencia de magnetización (Ikezaki *et al.*, 1997; Quesson *et al.*, 1997; Lemaire *et al.*, 2000). Sin embargo, el uso individual de cualquiera de estas técnicas para la delineación de los bordes tumorales presenta un elevado porcentaje de error. Existen varios estudios que han empleado la combinación de varios métodos de contraste. Eis y colaboradores llevaron a cabo uno de los primeros estudios en el que combinaron diferentes modalidades de imagen y analizaron cuantitativamente T_1 , T_2 y difusión en tres tipos de líneas celulares tumorales de rata (Eis *et al.*, 1995). Encontraron valores de T_1 , T_2 y ADC más altos en los tejidos tumorales que en los tejidos sanos. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas entre los tres tipos. En otros estudios llevados a cabo por Oh, mostraron que los valores calculados del ADC y del T_2 proporcionaban la suficiente información cuantitativa para estudiar la celularidad del tumor y para la caracterización del edema producido por el tumor, siendo la imagen de T_2 la más importante a la hora de caracterizar el tumor y el edema (Oh *et al.*, 2005). Els demostró que existía una correlación positiva entre los valores de ADC y T_2 en tumores cerebrales en rata (Els *et al.*, 1995). Barrati los correlacionó en cerebro de gato (Baratti *et al.*, 1999). Hasta ahora los estudios citados han implicado secuencias de imagen convencionales y secuencias de difusión pero fueron Lemaire y Vonarbourg quienes introdujeron la imagen por Transferencia de Magnetización en este método multiparamétrico. El estudio consistió en caracterizar dos tipos de líneas celulares tumorales en función de la variación de los parámetros de T_2 , ADC y %TM durante el crecimiento tumoral. Los dos tipos de gliomas que investigaron fueron: en primer lugar el desarrollado con células F98, las cuales producen tumores infiltrantes y en segundo lugar con células 9L que tienden a desarrollar gliomas con bajo o nulo grado de infiltración (Vonarbourg *et al.*, 2004). Estos datos son mostrados en la **Tabla XVII**

junto con los obtenidos en esta tesis. Se representan los valores correspondientes a la media de T_2 , ADC y %TM en la región tumoral y en la región contralateral.

Tabla XVII
Valores de T_2 , ADC y %TM en distintos tipos de Gliomas

Parámetros	Glioma 9L		Glioma F98		Glioma C6	
	Tej. sano	Tumor	Tej. sano	Tumor	Tej. sano	Tumor
T_2 (ms.)	57.8 ± 1.6	90.7 ± 1.6	56.3 ± 0.7	75.7 ± 1.7	46.66 ± 3.81	63.15 ± 6.72
ADC ($10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$)	0.59 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.57 ± 0.03	0.79 ± 0.03	0.66 ± 0.15	0.83 ± 0.15
% TM	30.6 ± 0.8	18.0 ± 0.8	29.6 ± 0.5	22.9 ± 0.5	35.54 ± 4.84	21.56 ± 3.41

Aunque los valores promedio son claramente diferentes entre el tejido tumoral y el tejido sano, cerca de los bordes tumorales estas diferencias se vuelven más difusas, especialmente en el caso de los tumores infiltrantes y de alta heterogeneidad. Normalmente los bordes tumorales se establecen basándose en la imagen que proporciona mejor contraste en cada caso, bien sea imagen ponderada en T_2 , en T_1 o imagen de ADC. Sin embargo, en el presente estudio hemos visto como el poder discriminante aumentaba drásticamente al utilizar toda la información disponible, llegando a discriminar con un acierto del 95% el tejido tumoral respecto al sano y al edema peritumoral. Curiosamente la imagen de TM resultó ser el factor dominante en la clasificación de los diferentes tipos de tejido. A parte de la TM, sólo la imagen de ADC mejoró significativamente el poder discriminante del análisis. Tanto los valores de T_2 como los de T_1 resultaron no ser factores significativos de clasificación. Por último, los bordes tumorales se calcularon a partir de las ecuaciones obtenidas en el análisis discriminante lineal. En otras palabras, después del análisis de clasificación, se generaron mapas paramétricos de predicción que muestran claramente diferenciadas las regiones estudiadas (tumor, tejido sano y edema). De esta manera se generaron mapas tricolor en el que cada uno de los colores representa la pertenencia a un grupo con una probabilidad de al menos un 90%. Aquellos datos que se clasifiquen con menos del 90% aparecen en las imágenes de color negro. Al observar dichos mapas tricolor vemos como apenas existe algún píxel de color negro, lo que indica que prácticamente todos los píxeles han sido clasificados correctamente con una probabilidad superior al 90% lo que permite delinear con gran precisión los bordes del tumor.

En resumen, aunque casi todos los estudios apuntaban en su momento a que las imágenes potenciadas en T_2 suministraban la información necesaria para localizar el tumor a través del edema peritumoral, en esta tesis se ha demostrado que la imagen de TM combinada con la imagen de ADC aporta mucha mayor especificidad en la delineación de los bordes tumorales.

6. Conclusiones

1. El glutatión oxidado constituye un sistema apropiado para el estudio de los fundamentos moleculares y termodinámicos de los procesos de Transferencia de Magnetización, al poseer grupos NH y NH₂ diferentes, susceptibles de intercambiar magnetización de manera característica con las moléculas de agua libre de la disolución.
2. La Transferencia de Magnetización entre las dos poblaciones de protones (grupos NH y protones del solvente) se produce a través de mecanismos diferentes dependiendo del grupo NH investigado, siendo función del pH, de la temperatura y de su estado de ionización.
3. Los procesos de transferencia de magnetización son más favorables para los intercambios H₂O_{ligada} -H₂O_{libre} que para los intercambios NH-H₂O. A pH 4.0 y 9.0, los intercambios de magnetización H₂O_{ligada} -H₂O_{libre} están dirigidos entrópicamente, y entálpicamente a pH 6.5. Sin embargo, los intercambios entre los protones de los grupos NH y las moléculas de agua están dirigidos entrópicamente en todos los casos. Así, las transferencias de magnetización dirigidas entrópicamente involucran un intercambio de carga eléctrica entre moléculas de agua, mientras que las dirigidas entálpicamente no involucran intercambio alguno de carga.
4. El estudio de química computacional de las formas zwitterionicas con respecto a los grupos protonados (NH₂ y NH) mostró que la distribución de moléculas de agua más favorable (energía de interacción más negativas), se da sobre el grupo NH₂ del glutámico, seguido por el grupo NH de la glicina y por último sobre el grupo NH de la cisteína. Debido a su localización espacial, el NH de la cisteína, se ve más afectado por los aumentos en microviscosidad disminuyendo su intercambio de magnetización con los protones del agua del solvente.

5. La difusión translacional de las moléculas de agua constituye el factor limitante en los procesos de Transferencia de Magnetización entre las dos poblaciones de protones *in vitro*. El aumento de la concentración del agente viscosizante disminuye la velocidad de translación de las moléculas de agua de la disolución debido a un aumento de las restricciones y tortuosidad molecular, disminuyendo consecuentemente el intercambio de magnetización.
6. La adquisición de imágenes de Transferencia de Magnetización proporciona una nueva herramienta de diagnóstico tumoral en imagen de Resonancia Magnética. La disminución del contenido biomolecular en la región tumoral, hace posible distinguir la zona de la lesión del tejido sano circundante, debido a que en la lesión disminuye el intercambio y con ello el porcentaje de Transferencia de Magnetización.
7. El empleo combinado de diferentes técnicas de imagen de Resonancia Magnética convencionales y cuantitativas, incluyendo ADC y Transferencia de Magnetización, ha permitido la delineación de los bordes tumorales con una probabilidad de acierto superior al 90%, un resultado que mejora significativamente los obtenidos empleando cada una de las modalidades de contraste por separado.

7. Bibliografía

1. **Agre, P.** Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004; *43*: 4278-90.
2. **Aime, S., Barge, A., Delli Castelli, D., Fedeli, F., Mortillaro, A., Nielsen, F. U. and Terreno, E.** Paramagnetic lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magn Reson Med* 2002; *47*: 639-48.
3. **Aime, S., Delli Castelli, D., Fedeli, F. and Terreno, E.** A paramagnetic MRI-CEST agent responsive to lactate concentration. *J Am Chem Soc* 2002; *124*: 9364-5.
4. **Alger, J. R. and Shulman, R. G.** NMR studies of enzymatic rates *in vitro* and *in vivo* by magnetization transfer. *Q Rev Biophys* 1984; *17*: 83-124.
5. **Allerhand, A. and Gutowsky, H. S.** Spin—Echo NMR Studies of Chemical Exchange. I. Some General Aspects. *The Journal of Chemical Physics* 1964; *41*: 2115-2126.
6. **Arnold, J. T. and Packard, M. E.** Variations in Absolute Chemical Shift of Nuclear Induction Signals of Hydroxyl Groups of Methyl and Ethyl Alcohol. *The Journal of Chemical Physics* 1951; *19*: 1608-1609.
7. **Aronen, H. J., Gazit, I. E., Louis, D. N., Buchbinder, B. R., Pardo, F. S., Weisskoff, R. M., Harsh, G. R., Cosgrove, G. R., Halpern, E. F., Hochberg, F. H. and et al.** Cerebral blood volume maps of gliomas: comparison with tumor grade and histologic findings. *Radiology* 1994; *191*: 41-51.
8. **Aronen, H. J., Pardo, F. S., Kennedy, D. N., Belliveau, J. W., Packard, S. D., Hsu, D. W., Hochberg, F. H., Fischman, A. J. and Rosen, B. R.** High microvascular blood volume is associated with high glucose uptake and tumor angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 2000; *6*: 2189-200.
9. **Auer, R. N., Del Maestro, R. F. and Anderson, R.** A simple and reproducible experimental *in vivo* glioma model. *Can J Neurol Sci* 1981; *8*: 325-31.
10. **Back, T., Mockel, R., Hirsch, J. G., Gaa, J., Oertel, W. H., Hennerici, M. G. and Gass, A.** Combined MR measurements of magnetization transfer, tissue diffusion and proton spectroscopy. A feasibility study with neurological cases. *Neurol Res* 2003; *25*: 292-300.
11. **Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. and Englander, S. W.** Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* 1993; *17*: 75-86.
12. **Bain, A. D.** Chemical exchange in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2003; *43*: 63–103.
13. **Balaban, R. S. and Ceckler, T. L.** Magnetization transfer contrast in magnetic resonance imaging. *Magn Reson Q* 1992; *8*: 116-37.
14. **Bancroft, J. and Gamble, M.** Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. Edinburgh. 2002
15. **Baratti, C., Barnett, A. S. and Pierpaoli, C.** Comparative MR imaging study of brain maturation in kittens with T_1 , T_2 , and the trace of the diffusion tensor. *Radiology* 1999; *210*: 133-42.
16. **Barone, V. and Cossi, M.** Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *J. Phys. Chem. A* 1998; *102*: 1995-2001.
17. **Becke, A. J.** Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Chem. Phys.* 1993; *98*: 5648-5652.
18. **Benabid, A. L., Remy, C. and Chauvin, C.** Experimental model of rat brain tumors by stereotactic injection of C6 glioma and HTC hepatoma cell lines. *Biology of Brain Tumor* 1986; 221-226.
19. **Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. and Sweet, W.** Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 1968; *161*: 370-1.
20. **Benda, P., Someda, K., Messer, J. and Sweet, W. H.** Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* 1971; *34*: 310-23.

21. **Bennett, K. M., Hyde, J. S., Rand, S. D., Bennett, R., Krouwer, H. G., Rebro, K. J. and Schmainda, K. M.** Intravoxel distribution of DWI decay rates reveals C6 glioma invasion in rat brain. *Magn Reson Med* 2004; 52: 994-1004.
22. **Benveniste, H., Hedlund, L. W. and Johnson, G. A.** Mechanism of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke* 1992; 23: 746-54.
23. **Bernstein, J. J., Goldberg, W. J., Laws, E. R., Jr., Conger, D., Morreale, V. and Wood, L. R.** C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homografting: ultrastructure. *Neurosurgery* 1990; 26: 622-8.
24. **Bouzier, A. K., Goodwin, R., de Gannes, F. M., Valeins, H., Voisin, P., Canioni, P. and Merle, M.** Compartmentation of lactate and glucose metabolism in C6 glioma cells. A ¹³C and ¹H NMR study. *J Biol Chem* 1998; 273: 27162-9.
25. **Bradley, W. G. and Bydder, G. M.** Advanced MR imaging Techniques. Martin Dunitz. London. 1997
26. **Braun, S., Kallinowski, H.-O. and Berger, S.** 150 and more basic NMR experiments: a practical course. Wiley-VCH. Weinheim. 1998
27. **Bryant, R. G.** The dynamics of water-protein interactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1996; 25: 29-53.
28. **Cabrita, E. J. and Berger, S.** HR-DOSY as a new tool for the study of chemical exchange phenomena. *Magn Reson Chem* 2002; 40: S122-S127.
29. **Cabrita, E. J., Berger, S., Brauer, P. and Karger, J.** High-resolution DOSY NMR with spins in different chemical surroundings: influence of particle exchange. *J Magn Reson* 2002; 157: 124-31.
30. **Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. and Lauffer, R. B.** Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem Rev* 1999; 99: 2293-352.
31. **Carpenter, T. A., Colebrook, L. D., Hall, L. D. and Pierens, G. K.** Applications of Gradient-Selective COSY and DQCOSY to Brucine and Gibberellic Acid. *Magn. Reson. Chem.* 1992; 30: 768-773.
32. **Castillo, M., Smith, J. K., Kwock, L. and Wilber, K.** Apparent diffusion coefficients in the evaluation of high-grade cerebral gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 60-4.
33. **Cossi, M., Rega, N., Scalmani, G. and Barone, V.** Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comp. Chem.* 2003; 24: 669-681.
34. **Crooks, L.** Image contrast mechanism in IRM. 1988.
35. **Cruciani, G.** Molecular Interaction Fields: Applications in Drug Discovery and ADME Prediction. 2005.
36. **Chen, W. and Hu, J.** Mapping brain metabolites using a double echo-filter metabolite imaging (DEFMI) technique. *J Magn Reson* 1999; 140: 363-70.
37. **Chicoine, M. R. and Silbergeld, D. L.** Assessment of brain tumor cell motility *in vivo* and *in vitro*. *J Neurosurg* 1995; 82: 615-22.
38. **Chien, D., Kwong, K. K., Gress, D. R., Buonanno, F. S., Buxton, R. B. and Rosen, B. R.** MR diffusion imaging of cerebral infarction in humans. *AJNR Am J Neuroradiol* 1992; 13: 1097-102; discussion 1103-5.
39. **Choyke, P. L., Dwyer, A. J. and Knopp, M. V.** Functional tumor imaging with dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging* 2003; 17: 509-20.
40. **Damadian, R.** Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* 1971; 171: 1151-3.
41. **Davis, A. L., Laue, E. D., Keeler, J., Moskau, D. and Lohman, J.** Absorption-Mode Two-Dimensional NMR Spectra Recorded Using Pulsed Field Gradients. *J. Magn. Reson.* 1991; 94: 637-644.

42. **De Boer, R. W.** Magnetization Transfer Contrast. Part 2. Clinical applications. *Medica Mundi* 1995; 40: 74-83.
43. **Deloire-Grassin, M. S., Brochet, B., Quesson, B., Delalande, C., Dousset, V., Canioni, P. and Petry, K. G.** *In vivo* evaluation of remyelination in rat brain by magnetization transfer imaging. *J Neurol Sci* 2000; 178: 10-6.
44. **Donahue, K. M., Krouwer, H. G., Rand, S. D., Pathak, A. P., Marszalkowski, C. S., Censky, S. C. and Prost, R. W.** Utility of simultaneously acquired gradient-echo and spin-echo cerebral blood volume and morphology maps in brain tumor patients. *Magn Reson Med* 2000; 43: 845-53.
45. **Dousset, V., Grossman, R. I., Ramer, K. N., Schnall, M. D., Young, L. H., Gonzalez-Scarano, F., Lavi, E. and Cohen, J. A.** Experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis: lesion characterization with magnetization transfer imaging. *Radiology* 1992; 182: 483-91.
46. **Edzes, H. T. and Samulski, E. T.** Cross relaxation and spin diffusion in the proton NMR of hydrated collagen. *Nature* 1977; 265: 521-3.
47. **Eigen, M.** Proton transfer, acid-base catalysis and enzymatic hydrolysis. Part I: elementary processes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1964; 3: 1-19.
48. **Eis, M., Els, T. and Hoehn-Berlage, M.** High resolution quantitative relaxation and diffusion MRI of three different experimental brain tumors in rat. *Magn Reson Med* 1995; 34: 835-44.
49. **Eis, M., Els, T., Hoehn-Berlage, M. and Hossmann, K. A.** Quantitative diffusion MR imaging of cerebral tumor and edema. *Acta Neurochir Suppl* 1994; 60: 344-6.
50. **Els, T., Eis, M., Hoehn-Berlage, M. and Hossmann, K. A.** Diffusion-weighted MR imaging of experimental brain tumors in rats. *Magma* 1995; 3: 13-20.
51. **Eng, J., Ceckler, T. L. and Balaban, R. S.** Quantitative ¹H magnetization transfer imaging *in vivo*. *Magn Reson Med* 1991; 17: 304-14.
52. **Farrell, C. L., Stewart, P. A. and Del Maestro, R. F.** A new glioma model in rat: the C6 spheroid implantation technique permeability and vascular characterization. *J Neurooncol* 1987; 4: 403-15.
53. **Fernandez-Seara, M. A., Wehrli, S. L. and Wehrli, F. W.** Diffusion of exchangeable water in cortical bone studied by nuclear magnetic resonance. *Biophys J* 2002; 82: 522-9.
54. **Ferrage, F., Zoonens, M., Warschawski, D. E., Popot, J. L. and Bodenhausen, G.** Slow diffusion of macromolecular assemblies by a new pulsed field gradient NMR method. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 2541-5.
55. **Finelli, D. A.** Diffusion-weighted imaging of acute vertebral compressions: specific diagnosis of benign versus malignant pathologic fractures. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 241-2.
56. **Forsén, S. and Hoffman, R. A.** Study of Moderately Rapid Chemical Exchange Reactions by Means of Nuclear Magnetic Double Resonance. *The Journal of Chemical Physics* 1963; 39: 2892-2901.
57. **Fung, B. M.** Nuclear magnetic resonance study of water interactions with proteins, biomolecules, membranes, and tissues. *Methods Enzymol* 1986; 127: 151-61.
58. **Gillies, R. J., Raghunand, N., Garcia-Martin, M. L. and Gatenby, R. A.** pH imaging. A review of pH measurement methods and applications in cancers. *IEEE Eng Med Biol Mag* 2004; 23: 57-64.
59. **Gochberg, D. F., Kennan, R. P., Maryanski, M. J. and Gore, J. C.** The role of specific side groups and pH in magnetization transfer in polymers. *J Magn Reson* 1998; 131: 191-198.
60. **Gochberg, D. F., Kennan, R. P., Robson, M. D. and Gore, J. C.** Quantitative imaging of magnetization transfer using multiple selective pulses. *Magn Reson Med* 1999; 41: 1065-72.

61. **Goffeney, N., Bulte, J. W., Duyn, J., Bryant, L. H., Jr. and van Zijl, P. C.** Sensitive NMR detection of cationic-polymer-based gene delivery systems using saturation transfer via proton exchange. *J Am Chem Soc* 2001; *123*: 8628-9.
62. **Goodford, P. J.** A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* 1985; *28*: 849-57.
63. **Grobbs, B., De Deyn, P. P. and Slegers, H.** Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 2002; *310*: 257-70.
64. **Grossman, R. I.** Magnetization transfer in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994; *36 Suppl*: S97-9.
65. **Grossman, R. I., Gomori, J. M., Ramer, K. N., Lexa, F. J. and Schnall, M. D.** Magnetization transfer: theory and clinical applications in neuroradiology. *Radiographics* 1994; *14*: 279-90.
66. **Guivel-Scharen, V., Sinnwell, T., Wolff, S. D. and Balaban, R. S.** Detection of proton chemical exchange between metabolites and water in biological tissues. *J Magn Reson* 1998; *133*: 36-45.
67. **Gupta, R. K., Sinha, U., Cloughesy, T. F. and Alger, J. R.** Inverse correlation between choline magnetic resonance spectroscopy signal intensity and the apparent diffusion coefficient in human glioma. *Magn Reson Med* 1999; *41*: 2-7.
68. **Gutowsky, H. S. and Holm, C. H.** Rate Processes and Nuclear Magnetic Resonance Spectra. II. Hindered Internal Rotation of Amides. *The Journal of Chemical Physics* 1956; *25*: 1228-1234.
69. **Gutowsky, H. S. and Saika, A.** Dissociation, Chemical Exchange, and the Proton Magnetic Resonance in Some Aqueous Electrolytes. *The Journal of Chemical Physics* 1953; *21*: 1688-1694.
70. **Gutowsky, H. S., Vold, R. L. and Wells, E. J.** Theory of Chemical Exchange Effects in Magnetic Resonance. *The Journal of Chemical Physics* 1965; *43*: 4107-4125.
71. **Halgren, T. A.** Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comp. Chem.* 1996; *17*: 490-519.
72. **Hanyu, H., Asano, T., Sakurai, H., Takasaki, M., Shindo, H. and Abe, K.** Magnetization transfer measurements of the hippocampus in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2001; *188*: 79-84.
73. **Hawlicka, E.** Self-diffusion in multicomponent liquid systems. *Chem. Soc. Rev.* 1995; *34*: 13743-13750.
74. **Hein, P. A., Eskey, C. J., Dunn, J. F. and Hug, E. B.** Diffusion-weighted imaging in the follow-up of treated high-grade gliomas: tumor recurrence versus radiation injury. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004; *25*: 201-9.
75. **Henkelman, R. M., Huang, X., Xiang, Q. S., Stanisz, G. J., Swanson, S. D. and Bronskill, M. J.** Quantitative interpretation of magnetization transfer. *Magn Reson Med* 1993; *29*: 759-66.
76. **Henkelman, R. M., Stanisz, G. J. and Graham, S. J.** Magnetization transfer in MRI: a review. *NMR Biomed* 2001; *14*: 57-64.
77. **Herneth, A. M., Guccione, S. and Bednarski, M.** Apparent diffusion coefficient: a quantitative parameter for *in vivo* tumor characterization. *Eur J Radiol* 2003; *45*: 208-13.
78. **Herneth, A. M., Naude, J., Philipp, M., Beichel, R., Trattinig, S. and Imhof, H.** [The value of diffusion-weighted MRT in assessing the bone marrow changes in vertebral metastases]. *Radiologe* 2000; *40*: 731-6.
79. **Hills, B. P.** The proton exchange cross-relaxation model of water relaxation in biopolymer systems. *Molecular Physics* 1992; *76*: 509-523.
80. **Hills, B. P.** The proton exchange cross-relaxation model of water relaxation in biopolymer systems. *Molecular Physics* 1992; *76*: 489-508.
81. **Holland, E. C.** Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; *97*: 6242-4.

82. **Horsfield, M. A.** Magnetization transfer imaging in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2005; *15*: 58S-67S.
83. **Hsieh, P. and Balaban, R.** 31P imaging of *in vivo* creatine kinase reaction rates. *J Magn Reson* 1987; *74*: 574-579.
84. **Hsieh, P. S. and Balaban, R. S.** Saturation and inversion transfer studies of creatine kinase kinetics in rabbit skeletal muscle *in vivo*. *Magn Reson Med* 1988; *7*: 56-64.
85. **Hurd, R. E.** Gradient-Enhanced Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 1990; *87*: 422-428.
86. **Husstedt, H. W., Sickert, M., Kostler, H., Haubitz, B. and Becker, H.** Diagnostic value of the fast-FLAIR sequence in MR imaging of intracranial tumors. *Eur Radiol* 2000; *10*: 745-52.
87. **Ikezaki, K., Takahashi, M., Koga, H., Kawai, J., Kovacs, Z., Inamura, T. and Fukui, M.** Apparent diffusion coefficient (ADC) and magnetization transfer contrast (MTC) mapping of experimental brain tumor. *Acta Neurochir Suppl* 1997; *70*: 170-172.
88. **Kennan, R. P., Richardson, K. A., Zhong, J., Maryanski, M. J. and Gore, J. C.** The effects of cross-link density and chemical exchange on magnetization transfer in polyacrylamide gels. *J Magn Reson B* 1996; *110*: 267-77.
89. **Kingsley, P. B.** Methods of measuring spin-lattice (T1) relaxation times. An annotated bibliography. *Conc. Magn. Reson.* 1999; *11*: 243-276.
90. **Kiortsis, D. N., Argyropoulou, M. I., Bitsis, S., Tsatsoulis, A. and Efremidis, S.** Magnetization transfer technique: a new diagnostic tool for the postoperative assessment of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; *53*: 399-400.
91. **Kobayashi, N., Allen, N., Clendenon, N. R. and Ko, L. W.** An improved rat brain-tumor model. *J Neurosurg* 1980; *53*: 808-15.
92. **Kruiskamp, M. J. and Nicolay, K.** On the importance of exchangeable NH protons in creatine for the magnetic coupling of creatine methyl protons in skeletal muscle. *J Magn Reson* 2001; *149*: 8-12.
93. **Kyte, J.** Structure in Protein Chemistry. Garland Publishing, Inc. Londres. 1995
94. **Lam, W. W., Poon, W. S. and Metreweli, C.** Diffusion MR imaging in glioma: does it have any role in the pre-operation determination of grading of glioma? *Clin Radiol* 2002; *57*: 219-25.
95. **Lang, P., Wendland, M. F., Saeed, M., Gindele, A., Rosenau, W., Mathur, A., Gooding, C. A. and Genant, H. K.** Osteogenic sarcoma: noninvasive *in vivo* assessment of tumor necrosis with diffusion-weighted MR imaging. *Radiology* 1998; *206*: 227-35.
96. **Lauterbur, P. C.** Image formation by induced local Interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature* 1973; *242*: 190-191.
97. **Lee, C., Yang, W. and Parr, R. G.** Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* 1988; *37*: 785-789.
98. **Leibfritz, D. and Dreher, W.** Magnetization transfer MRS. *NMR Biomed* 2001; *14*: 65-76.
99. **Leijon, M.** Proton exchange rates measured by saturation transfer using delayed randomization of the solvent magnetization. *J Magn Reson B* 1996; *112*: 181-5.
100. **Lemaire, L., Franconi, F., Saint-Andre, J. P., Roullin, V. G., Jallet, P. and Le Jeune, J. J.** High-field quantitative transverse relaxation time, magnetization transfer and apparent water diffusion in experimental rat brain tumour. *NMR Biomed* 2000; *13*: 116-23.
101. **Liddel, U. and Ramsey, N. F.** Temperature Dependent Magnetic Shielding in Ethyl Alcohol. *The Journal of Chemical Physics* 1951; *19*: 1608.
102. **Liepinsh, E. and Otting, G.** Proton exchange rates from amino acid side chains--implications for image contrast. *Magn Reson Med* 1996; *35*: 30-42.
103. **Lufkin, R.** The IRM Manual. MOSBY. Missouri, USA. 1998
104. **Lundbom, N.** Determination of magnetization transfer contrast in tissue: an MR imaging study of brain tumors. *AJR Am J Roentgenol* 1992; *159*: 1279-85.

105. **Mansfield, P. and Pykett, I. L.** Biological and medical imaging by NMR. *J Magn Reson* 1978; 29: 355-373.
106. **Marshall, A. G.** Biophysical Chemistry: Principles, Techniques, and Applications. Wiley. New York. 1978
107. **McConnell, H. M.** Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance. *The Journal of Chemical Physics* 1958; 28: 430-431.
108. **Mehta, R. C., Pike, G. B. and Enzmann, D. R.** Magnetization transfer magnetic resonance imaging: a clinical review. *Top Magn Reson Imaging* 1996; 8: 214-30.
109. **Moonen, C. T. W., Van Gelderen, P., Vuister, G. W. and Van Zijl, P. C. M.** Gradient-enhanced exchange spectroscopy. *J Magn Reson* 1992; 97: 419-425.
110. **Mori, S., Eleff, S. M., Pilatus, U., Mori, N. and van Zijl, P. C.** Proton NMR spectroscopy of solvent-saturable resonances: a new approach to study pH effects in situ. *Magn Reson Med* 1998; 40: 36-42.
111. **Morris, P.** Nuclear Magnetic Resonance Imaging in Medicine and Biology. 1986; 77-374.
112. **Nagano, N., Sasaki, H., Aoyagi, M. and Hirakawa, K.** Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 1993; 86: 117-25.
113. **Nicolay, K., Braun, K. P., Graaf, R. A., Dijkhuizen, R. M. and Kruiskamp, M. J.** Diffusion NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 2001; 14: 94-111.
114. **Nitz, W. R. and Reimer, P.** Contrast mechanisms in MR imaging. *Eur. Radiol.* 1999; 9: 1032-1046.
115. **Oh, J., Cha, S., Aiken, A. H., Han, E. T., Crane, J. C., Stainsby, J. A., Wright, G. A., Dillon, W. P. and Nelson, S. J.** Quantitative apparent diffusion coefficients and T2 relaxation times in characterizing contrast enhancing brain tumors and regions of peritumoral edema. *J Magn Reson Imaging* 2005; 21: 701-8.
116. **Parizel, P. M., Degryse, H. R., Gheuens, J., Martin, J. J., Van Vyve, M., De La Porte, C., Selosse, P., Van de Heyning, P. and De Schepper, A. M.** Gadolinium-DOTA enhanced MR imaging of intracranial lesions. *J Comput Assist Tomogr* 1989; 13: 378-85.
117. **Pauleit, D., Langen, K. J., Floeth, F., Hautzel, H., Riemenschneider, M. J., Reifenberger, G., Shah, N. J. and Muller, H. W.** Can the apparent diffusion coefficient be used as a noninvasive parameter to distinguish tumor tissue from peritumoral tissue in cerebral gliomas? *J Magn Reson Imaging* 2004; 20: 758-64.
118. **Paxinos, G. and Watson, C.** The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press. New York. 1997
119. **Portais, J. C., Martin, M., Canioni, P. and Merle, M.** Glutathione, but not glutamine, is detected in ¹³C-NMR spectra of perchloric acid extracts from C6 glioma cells. *FEBS Lett* 1993; 327: 301-6.
120. **Portais, J. C., Schuster, R., Merle, M. and Canioni, P.** Metabolic flux determination in C6 glioma cells using carbon-13 distribution upon [¹⁻¹³C]glucose incubation. *Eur J Biochem* 1993; 217: 457-68.
121. **Prager, J. M., Rosenblum, J. D., Huddle, D. C., Diamond, C. K. and Metz, C. E.** The magnetization transfer effect in cerebral infarction. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994; 15: 1497-500.
122. **Pui, M. H.** Magnetization transfer analysis of brain tumor, infection, and infarction. *J Magn Reson Imaging* 2000; 12: 395-9.
123. **Quesson, B., Bouzier, A. K., Thiaudiere, E., Delalande, C., Merle, M. and Canioni, P.** Magnetization transfer fast imaging of implanted glioma in the rat brain at 4.7 T: interpretation using a binary spin-bath model. *J Magn Reson Imaging* 1997; 7: 1076-83.
124. **Raila, F. A., Bowles, A. P., Jr., Perkins, E. and Terrell, A.** Sequential imaging and volumetric analysis of an intracerebral C6 glioma by means of a clinical MRI system. *J Neurooncol* 1999; 43: 11-7.

125. **San-Galli, F., Vrignaud, P., Robert, J., Coindre, J. M. and Cohadon, F.** Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *J Neurooncol* 1989; 7: 299-304.
126. **Santoro, J. and Bruix, M.** Intercambio Químico.Grupo Especializado de RMN de la RSEQ.2005
127. **Scherzinger, A. L. and Hendee, W. R.** Basic principles of magnetic resonance imaging--an update. *West J Med* 1985; 143: 782-92.
128. **Snoussi, K., Bulte, J. W., Gueron, M. and van Zijl, P. C.** Sensitive CEST agents based on nucleic acid imino proton exchange: detection of poly(rU) and of a dendrimer-poly(rU) model for nucleic acid delivery and pharmacology. *Magn Reson Med* 2003; 49: 998-1005.
129. **Snoussi, K., Bulte, J. W., Gueron, M. and van Zijl, P. C.** Sensitive CEST agents based on nucleic acid imino proton exchange: detection of poly(rU) and of a dendrimer-poly(rU) model for nucleic acid delivery and pharmacology. *Magn Reson Med* 2003; 49: 998-1005.
130. **Spencer, R. G. and Fishbein, K. W.** Measurement of spin-lattice relaxation times and concentrations in systems with chemical exchange using the one-pulse sequence: breakdown of the Ernst model for partial saturation in nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson* 2000; 142: 120-35.
131. **Stadnik, T. W., Chaskis, C., Michotte, A., Shabana, W. M., van Rompaey, K., Luybaert, R., Budinsky, L., Jellus, V. and Osteaux, M.** Diffusion-weighted MR imaging of intracerebral masses: comparison with conventional MR imaging and histologic findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 969-76.
132. **Stanisz, G. J., Odrobina, E. E., Pun, J., Escaravage, M., Graham, S. J., Bronskill, M. J. and Henkelman, R. M.** T1, T2 relaxation and magnetization transfer in tissue at 3T. *Magn Reson Med* 2005; 54: 507-12.
133. **Sugahara, T., Korogi, Y., Kochi, M., Ikushima, I., Shigematu, Y., Hirai, T., Okuda, T., Liang, L., Ge, Y., Komohara, Y., Ushio, Y. and Takahashi, M.** Usefulness of diffusion-weighted MRI with echo-planar technique in the evaluation of cellularity in gliomas. *J Magn Reson Imaging* 1999; 9: 53-60.
134. **Tien, R. D., Felsberg, G. J., Friedman, H., Brown, M. and MacFall, J.** MR imaging of high-grade cerebral gliomas: value of diffusion-weighted echoplanar pulse sequences. *AJR Am J Roentgenol* 1994; 162: 671-7.
135. **van der Flier, W. M., van den Heuvel, D. M., Weverling-Rijnsburger, A. W., Bollen, E. L., Westendorp, R. G., van Buchem, M. A. and Middelkoop, H. A.** Magnetization transfer imaging in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002; 52: 62-7.
136. **van Zijl, P. C., Zhou, J., Mori, N., Payen, J. F., Wilson, D. and Mori, S.** Mechanism of magnetization transfer during on-resonance water saturation. A new approach to detect mobile proteins, peptides, and lipids. *Magn Reson Med* 2003; 49: 440-449.
137. **Vonarbourg, A., Sapin, A., Lemaire, L., Franconi, F., Menei, P., Jallet, P. and Le Jeune, J. J.** Characterization and detection of experimental rat gliomas using magnetic resonance imaging. *Magma* 2004; 17: 133-9.
138. **Wang, Y., Grist, T. M. and Mistretta, C. A.** Dispersion in magnetization transfer contrast at a given specific absorption rate due to variations of RF pulse parameters in the magnetization transfer preparation. *Magn Reson Med* 1997; 37: 957-62.
139. **Ward, K. M., Aletras, A. H. and Balaban, R. S.** A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J Magn Reson* 2000; 143: 79-87.
140. **Ward, K. M. and Balaban, R. S.** Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magn Reson Med* 2000; 44: 799-802.
141. **Westbrook, C.** *IRM in Practice.* Blackwell Scientific Publications.London.1993

142. **Whittle, I. R., Macarthur, D. C., Malcolm, G. P., Li, M., Washington, K. and Ironside, J. W.** Can experimental models of rodent implantation glioma be improved? A study of pure and mixed glioma cell line tumours. *J Neurooncol* 1998; *36*: 231-42.
143. **Wilmes, L. J., Hoehn-Berlage, M., Els, T., Bockhorst, K., Eis, M., Bonnekoh, P. and Hossmann, K. A.** *In vivo* relaxometry of three brain tumors in the rat: effect of Mn-TPPS, a tumor-selective contrast agent. *J Magn Reson Imaging* 1993; *3*: 5-12.
144. **Woessner, D. E.** Nuclear Transfer Effects in Nuclear Magnetic Resonance Pulse Experiments. *The Journal of Chemical Physics* 1961; *35*: 41-48.
145. **Woessner, D. E., Zhang, S., Merritt, M. E. and Sherry, A. D.** Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI. *Magn Reson Med* 2005; *53*: 790-9.
146. **Wolff, S. D. and Balaban, R. S.** Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation *in vivo*. *Magn Reson Med* 1989; *10*: 135-44.
147. **Wolff, S. D. and Balaban, R. S.** NMR imaging of labile proton exchange. *J. Magn. Reson* 1990; *86*: 164-169.
148. **Wolff, S. D. and Balaban, R. S.** Magnetization transfer imaging: practical aspects and clinical applications. *Radiology* 1994; *192*: 593-9.
149. **Wüthrich, K.** NMR of Proteins and Nuclei Acids. Wiley-Interscience. New York. 1986
150. **Wüthrich, K. and Wagner, G.** Nuclear magnetic resonance of labile protons in the basic pancreatic trypsin inhibitor. *Journal of Molecular Biology* 1979; *130*: 1-18.
151. **Yoshikawa, K., Okada, Y., Minami, M., Itoh, M., Aoki, S., Ohtomo, K. and Iio, M.** Analysis of imaging parameters, relaxation time (T1,T2), and relative proton density as they influence the signal intensity of spin echo images. *Radiat Med* 1985; *3*: 214-24.
152. **Zhang, S. and Sherry, A. D.** Physical characteristics of lanthanide complexes that act as magnetization transfer (MT) contrast agents. *Journal of Solid State Chemistry* 2003; *171*: 38-43.
153. **Zhang, S., Winter, P., Wu, K. and Sherry, A. D.** A novel europium(III)-based MRI contrast agent. *J Am Chem Soc* 2001; *123*: 1517-8.
154. **Zhou, J., Lal, B., Wilson, D. A., Larterra, J. and van Zijl, P. C.** Amide proton transfer (APT) contrast for imaging of brain tumors. *Magn Reson Med* 2003; *50*: 1120-6.
155. **Zhou, J., Payen, J. F., Wilson, D. A., Traystman, R. J. and van Zijl, P. C.** Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI. *Nat Med* 2003; *9*: 1085-90.
156. **Zhou, J. and van Zijl, P. C. M.** Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2006; *48*: 109-136.
157. **Zhou, J., Wilson, D. A., Sun, P. Z., Klaus, J. A. and Van Zijl, P. C.** Quantitative description of proton exchange processes between water and endogenous and exogenous agents for WEX, CEST, and APT experiments. *Magn Reson Med* 2004; *51*: 945-52.
158. **Zhu, X. P., Li, K. L., Kamaly-Asl, I. D., Checkley, D. R., Tessier, J. J., Waterton, J. C. and Jackson, A.** Quantification of endothelial permeability, leakage space, and blood volume in brain tumors using combined T1 and T2* contrast-enhanced dynamic MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2000; *11*: 575-85.